

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA



ESTUDIO DE LOS TELÓMEROS EN
Dictyostelium discoideum.
DESARROLLO DE UN MODELO CELULAR
DE DISQUERATOSIS CONGÉNITA

TESIS DOCTORAL

JAVIER RODRÍGUEZ CENTENO

Madrid, 2017

DEPARTAMENTO BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID



ESTUDIO DE LOS TELÓMEROS EN
Dictyostelium discoideum.
DESARROLLO DE UN MODELO CELULAR
DE DISQUERATOSIS CONGÉNITA

Memoria presentada por

JAVIER RODRÍGUEZ CENTENO

Licenciado en Biología, para optar al grado de Doctor por la Universidad
Autónoma de Madrid

Director de tesis:

Dr. Leandro Sastre Garzón

Investigador científico

Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”

CSIC-UAM





Por la presente, **Leadro Sastre Garzón**, Investigador Científico del CSIC y adscrito al Instituto de Investigaciones Biomédicas de Madrid “Alberto Sols”, certifico que:

D. Javier Rodríguez Centeno, Licenciado en Biología por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo mi dirección su Tesis Doctoral titulada:

“ESTUDIO DE LOS TELÓMEROS EN *Dictyostelium discoideum*. DESARROLLO DE UN MODELO CELULAR DE DISQUERATOSIS CONGÉNITA” en el Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”.

Considero que la presente Tesis Doctoral reúne a mi juicio las condiciones de originalidad y rigor necesarios y, por lo tanto, se encuentra en condiciones de ser presentada y defendida públicamente para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Para que conste a todos los efectos, firmo la presente autorización para la defensa de esta Tesis en Madrid a 3 de Abril del 2017.

Dr Leandro Sastre Garzón

Director de la Tesis

Investigador Científico

CSIC

A mí hijo

**Pero sus estridentes ladridos sólo son señal de que
cabalgamos**

(Goethe)

AGRADECIMIENTOS

Una noche sentado ante el ordenador escribiendo –una noche sentado ante el ordenador– me di cuenta que estaba escribiendo por fin, al fin el fin. Estaba escribiendo las últimas palabras que completarían esta tesis. Las palabras para agradecer a todos aquellos que han empujado para que esta tesis exista se quedan eternamente cortas.

En primer lugar, agradecer la confianza depositada en mí a los Doctores Leandro Sastre Garzón y Rosario Perona Abellón. El mecenazgo es muy importante para hacer a los que empezamos en ciencia personas dignas, pero lo es aún más el sentirte querido y válido para el desempeño de esta tarea. Gracias Leandro por haberme acompañado en este camino. Las personas que poseen respuesta para absolutamente cualquier pregunta, las personas que destilan sabiduría y conocimiento en cada frase, son piezas irremplazables en ciencia, pero también en la vida. En ti he visto el “dadme un punto de apoyo y ...”. Estás obligado a ser un pilar básico de este centro. Gracias Rosario, por ser parte, testigo y sostén de esta tesis. Es tremendamente reconfortante saber que existe alguien que lucha por tu bienestar y que intenta sacar a flote una y otra vez el barco de la financiación que tantos agujeros tiene ya en España. Gracias a los dos, sois un binomio perfecto, por lo que sabéis y si cabe y más importante, por lo que sois.

A mi “harén” científico, a todas vosotras, gracias por aguantarme, por ser una tribu estrogénica tan reconfortante en la cual volvería una y mil veces a empezar de nuevo. Gracias Laurita, de ti he aprendido a veces a cabezazos y a veces a carcajadas que existe una amplia gama de grises en donde está la virtud. El tan valiente proyecto que hoy estás gestando será tu mayor y mejor experimento. Gracias por todas tus enseñanzas. Gracias Blanca, eres la medida y la meticulosidad con la que debemos de trabajar en este mundo. La vida te ha enseñado a ser fuerte y eso se nota. Gracias Laura por compartir mi mismo sino, de ti he aprendido que se puede estar con el agua al cuello y sonreír al mismo tiempo, es una virtud que debes de enseñar a la pequeña Leire, ella será tu gran tesis. Gracias Cristina, por ser el comodín de todos y para todo, gracias por tu polivalencia y tu multifacetismo, tu disco duro vale oro. Gracias a las iniciadoras (M. Galardi, Vero, M. Cortés y Vane), por abrirme camino, por aguantar mis inicios, y sobre todo enhorabuena por seguir en esta cuerda a menudo tan larga y estrecha, de las que os resistís a bajaros. Gracias Jaime por ser como eres, por todos tus consejos, fuiste un apoyo muy importante entre tantas equis juntas. Gracias a Olatz, como viniste te fuiste dejando un valioso y precioso recuerdo txuri-urdin. Gracias a Beíta por aguantar mis continuas tonterías cosladeñas y por esas maravillosas alícuotas de anticuerpo, te espera un futuro prometedor. Bea Mena, gracias por la ayuda tan necesaria y valiosa en el último empujón, tu forma de ser es tu más valioso tesoro, gracias por compartirlo. Gracias Lucía por tu maravillosa disposición y tu admirable simpatía, coge fuerzas que se avecinan “*skinny cows*”. Gracias a Rebeca por el principio del principio por la ilusión con la que veíamos este mundo. Gracias a las estudiantes Marta y Estela que como efecto colateral participaron de este proyecto.

Gracias Jaime Renart por tu maravilloso arcón de raras enzimas y tu armario de reactivos extintos. Gracias por tus consejos y ayuda en estos años. Gracias R. Escalante por tu ayuda y a tu laboratorio (Sandra, Bea, Ana, Javi, Natalia y Sergio) por compartir compañero de estudio, y por vuestras maravillosas células que nunca se contaminan. Gracias al laboratorio 1.9 al completo por ser la frescura de la ciencia. Gracias a Isabel del 2.14 por el interés demostrado en el desarrollo de esta tesis y por supuesto por resolverme dudas burocráticas, las peores. Gracias al 2.9 por la centrífuga de cuantitativas. Gracias Yuri, ya lo hemos conseguido, forza Juve! Gracias Lucía G.G. por interesarte tantas veces por todo en los pasillos. Gracias a la gente del IdiPaz, en especial a la futura doctora Pernia. Recuerdo como si fuese hoy aquellas OVX en la UCM, y como el mundo es un pañuelo de nuevo compartimos centro y barrio.

Por supuesto esta tesis no habría sido posible sin vuestro dedicado trabajo. Gracias a todos los servicios del IIB que desempeñan una labor fundamental para que nuestro trabajo vea la luz. En especial a Lola, ir a al confocal del SIDI, debería ser patrimonio de la humanidad. Gracias Carlos, gracias Diego, sois unos personajes maravillosos.

Gracias a Iñigo Azoitia, a ti te debo las bases y el gran consejo que hizo que hoy pueda ser doctor. Gracias a todos de los que aprendí, departamento de Genética, Facultad de Medicina, departamento de Biología Celular e Instituto Cajal.

Gracias a tanta gente que ha pasado por mi vida pero sobre todo a los que decidieron quedarse.

Gracias Carmen por darme el mejor regalo, mi hijo.

Resumen

Los telómeros son estructuras formadas por ADN y proteínas que protegen los extremos de los cromosomas. Son estructuras esenciales para el mantenimiento de la integridad genómica. Debido a que la maquinaria de replicación no puede copiar completamente los extremos del ADN, los telómeros son extendidos por mecanismos complementarios incluyendo la actividad del complejo telomerasa y el mecanismo ALT (del inglés, *Alternative Lengthening of Telomeres*). En *Dictyostelium discoideum* los extremos de los cromosomas no se han podido secuenciar completamente pero se sabe que presentan copias parciales del elemento extracromosomal de ADN ribosomal (ADNr). Este elemento presenta heterogeneidad en su extremos debido a la presencia de una región con la fórmula nucleotídica (CnT)m. En esta tesis hemos completado y ordenado la secuencia presente en este elemento demostrando la existencia de una hebra G y una hebra C y la presencia de un saliente monocatenario 3', elementos comunes en los telómeros de eucariotas. Nuestra investigación muestra que *D. discoideum* no presenta un complejo telomerasa funcional por lo que el mantenimiento de los telómeros puede darse por fenómenos de recombinación homóloga entre los extremos de los cromosomas y los de los elementos extracromosomales de ADNr. En apoyo de esta hipótesis, hemos observado que una serie de proteínas implicadas en recombinación que forman corpúsculos nucleares similares a los APBs (del inglés, *ALT-associated Promyelocytic Leukaemia (PML) Bodies*) presentes en células de mamífero que utilizan el mecanismo ALT también están localizadas en corpúsculos nucleares en *D. Discoideum*. Estos cuerpos parecen estar asociados con los nucléolos.

Posteriormente hemos desarrollado un modelo para el estudio de una enfermedad relacionada con el mantenimiento de los telómeros, la disqueratosis congénita. Hemos sobreexpresado en *D. discoideum* cuatro mutaciones patogénicas del gen que codifica disquerina. También hemos generado cepas de este organismo en los que el gen endógeno *dkc1* porta dos de estas mutaciones. Ninguna de las dos funciones principales asociadas a disquerina: el mantenimiento de los telómeros y la pseudouridilación del ARN, parecen afectadas por estas mutaciones. En cambio, la sobreexpresión de la proteína no mutada y de los mutantes producen menor proliferación celular y un aumento de la respuesta al daño del ADN, tanto en situación basal como en presencia del agente citotóxico bleomicina. Dos mutaciones del gen endógeno también producen aumento de la respuesta al daño del ADN en presencia de bleomicina sugiriendo una implicación directa de las mutaciones en disquerina con este proceso biológico.

Summary

Telomeres are structures composed by DNA and proteins that protect chromosome ends. They are essential to maintain genomic stability. DNA ends cannot be completely replicated by DNA polymerases and, therefore, telomeres have to be extended by complementary mechanism, including telomerase activity as well as the ALT (Alternative Lengthening of Telomeres) mechanism. The chromosome ends of *Dictyostelium discoideum* have not been completely sequenced but are known to contain partial copies of a extra-chromosomal element that contains rDNA genes. This element is heterogeneous at its ends due to the presence of a region with variable number of copies of the $(C_nT)_m$ sequence. In this Thesis we have completed and arranged this sequence showing the presence of G-rich and C-rich strands and a 3'-overhanging single strand region. These elements are common in most eukaryotic telomeres. The data reported in this Thesis show that *D. discoideum* does not present a functional telomerase complex and that telomere elongation could depend on homologous recombination between chromosome ends and the end of extra-chromosomal rDNA elements. In support for this hypothesis, we have shown that proteins involved in DNA recombination, components of APB (ALT-associated Promyelocytic Leukemia (PML) Bodies) in mammalian cells that extend telomeres through the ALT mechanism, are also located in nuclear bodies in *D. discoideum*. These bodies seem to be associated with the nucleolus.

We have next developed a model for the study of the dyskeratosis congenita human disease in *D. discoideum*. Four pathogenic mutants of the dyskerin (DKC1) gene found in dyskeratosis patients were over-expressed in *D. discoideum*. In addition, mutant strains where two of these mutations were introduced in the endogenous gene were generated. Neither of the two main functions of dyskerin, telomere maintenance and RNA pseudouridylation, were affected by these mutations. Over-expression of the *D. discoideum* protein, either wild-type or mutated, resulted in decreased cell proliferation and increased response to DNA damage, both in basal conditions and upon treatment with the cytotoxic drug bleomycin. Two of the mutations introduced in the endogenous gene also produced increased DNA-damage response in the presence of bleomycin that makes us suggest a direct implication of dyskerin mutation in this biological process.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	23
INTRODUCCIÓN.....	27
1. <i>Dictyostelium discoideum</i>.....	29
1.1. Filogenia.....	29
1.2. Genoma y proteoma.....	30
1.3. Ciclo de vida.....	30
1.3.1. Fase vegetativa. Estado unicelular.....	30
1.3.2. Ciclo pluricelular.....	31
1.3.2.1. Agregación.....	31
1.3.2.2. Diferenciación celular.....	33
2. Telómeros.....	34
3. Telomerasa.....	37
4. <i>Alternative Lengthening of Telomeres</i> (ALT).....	39
4.1. Características.....	40
4.1.1. Tamaño telomérico heterogéneo.....	40
4.1.2. <i>ALT-associated Promyelocytic leukaemia</i> (PML) Bodies (APBs).....	40
4.1.3. Repeticiones teloméricas extracromosomales.....	42
4.2. Proteínas implicadas en ALT.....	43
4.2.1. Complejo MRN.....	43
4.2.2. TRF2 y complejo shelterina.....	43
4.2.3. Helicasas de ADN semejantes a RecQ.....	43
4.2.4. Otras proteínas implicadas en ALT.....	44
5. Disquerina.....	44
6. Disqueratosis congénita.....	45
7. Pseudouridilación.....	46
8. Daño al ADN.....	48
OBJETIVOS.....	48
MATERIALES Y MÉTODOS.....	53
1. Crecimiento.....	55
2. Cepas empleadas.....	55

3. Estudio del extremo del elemento extracromosomal de ADNr	57
3.1. Diseño de los oligonucleótidos.....	57
3.2. Extremo 3' monocatenario.....	57
3.2.1. Secuencia.....	57
4. Construcción de vectores.....	58
4.1. Vectores utilizados.....	58
4.2. Construcciones.....	58
4.2.1. Vectores de sobreexpresión.....	58
4.2.1.1. <i>tert</i>	59
4.2.1.2. <i>dkc1</i>	59
4.2.1.3. <i>dkc1</i> mutada.....	60
4.2.1.4. <i>mre11</i>	60
4.2.1.5. <i>rad51</i>	60
4.2.1.6. <i>rad50</i>	60
4.2.1.7. <i>smc6</i>	61
4.2.1.8. <i>suvA</i>	61
4.2.2. Vector para la generación de la cepa <i>knock-out</i> de <i>tert</i>	63
4.2.3. Vector para la generación de los <i>knock-in</i> de <i>dkc1</i> . (Mut 1 y 2).....	63
5. Transfecciones.....	64
6. Generación de la cepa <i>knock-out</i> de <i>tert</i>.....	65
7. Generación de las cepas <i>knock-in</i> de <i>dkc1</i>.....	65
7.1. Transfección y análisis de los clones.....	65
7.2. Eliminación de la resistencia a blasticidina.....	65
8. Localización celular.....	65
8.1. Visualización de nucléolos.....	67
9. Estudio del crecimiento de la población.....	67
9.1. Curvas de crecimiento.....	67
9.2. Crecimiento sobre <i>Klebsiella aerogenes</i>	67
10. Ensayos de agregación.....	67
11. Análisis de la expresión génica.....	68
11.1. Extracción de ARN.....	68
11.2. qRT-PCR.....	68
12. Ensayo de pseudouridilación.....	69

12.1. Tratamiento con CMCT.....	69
12.2. RT-PCR cuantitativa.....	70
13. Niveles de maduración de ARN ribosomal (ARNr).....	70
14. Análisis del daño al ADN.....	71
14.1. Análisis por <i>western-blot</i>	71
14.1.1. Tratamiento con bleomicina.....	71
14.1.2. Aislamiento de proteínas nucleares.....	71
14.1.3. SDS-PAGE.....	71
14.2. Inmunofluorescencia.....	72
RESULTADOS.....	73
1. Telómeros.....	75
2. Tert.....	77
3. APBs (<i>ALT-associated-PML-bodies</i>).....	81
3.1. Mre11/Rad50.....	81
3.2. Rad51.....	84
3.3. Smc6.....	86
4. Disquerina.....	87
5. Modelo de disqueratosis congénita en <i>Dictyostelium discoideum</i>.....	90
5.1. Caracterización de las cepas que sobreexpresan los mutantes.....	91
5.1.1. Pseudouridilación.....	98
5.1.2. Daño al ADN.....	100
5.2. Caracterización de las cepas <i>knock-in</i> para los mutantes 1 y 2.....	102
5.2.1. Pseudouridilación.....	106
5.2.2. Daño al ADN.....	107
DISCUSIÓN.....	109
1. Telómeros.....	111
2. Telomerasa.....	112
3. ALT (<i>Alternative Lengthening of Telomeres</i>).....	114
4. Proteínas nucleolares y nucléolo. Disquerina.....	118
5. Disqueratosis congénita.....	119
CONCLUSIONES.....	127
BIBLIOGRAFÍA.....	131
ANEXO: Artículos que no forman parte de la tesis.....	147

Abreviaturas

- **Ψ:** Pseudouridina
- **3'-UTR:** *3'-Untranslated region* (Región 3' no traducida)
- **ACA:** Adenilato ciclasa
- **ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- **ADNc:** Ácido desoxirribonucleico complementario
- **ADNr:** Ácido desoxirribonucleico ribosomal
- **ALT:** *Alternative Lengthening of Telomeres* (Alargamiento alternativo de los telómeros)
- **AMPc:** Adenosín monofosfato cíclico
- **APB:** *ALT-associated Promyelocytic leukaemia (PML) Bodies* (Cuerpos de leucemia promielocítica asociados al alargamiento alternativo de los telómeros)
- **ARN:** Ácido ribonucleico
- **ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero
- **ARNr:** Ácido ribonucleico ribosómico
- **ARNt:** Ácido ribonucleico transferente
- **BEU:** Tampón compuesto de Bicine, EDTA y Urea
- **CMCT:** 1-ciclohexil-3-(2-morfolinoetil) carbodiimida meto-p-toluenosulfonato
- **C_T:** *Threshold cycle* (Ciclo umbral)
- **DAPI:** 4,6-Diamino-2-fenil-indol
- **DDR:** *DNA Damage Response* (Respuesta al daño en el ADN)
- **DSB:** *Double Strand Breaks* (Roturas de doble cadena)
- **DC:** Disqueratosis congénita
- **ECTR:** *ExtraChromosomal Telomere Repeat* (Repetición de telómero extracromosomal)
- **EDTA:** Ácido etilendiaminotetracético
- **G418:** Geneticina
- **GFP:** *Green Fluorescent Protein* (Proteína verde fluorescente)
- **HEPES:** Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanosulfónico
- **HL5:** Medio de cultivo completo
- **ID:** Número de identificación
- **ITS:** *Internal Transcribed Spacer* (Espaciador interno del transcrito)
- **KO:** *Knock-out*
- **M-MLV:** *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase* (Retrotranscriptasa Moloney del virus de la leucemia murina)

- **N:** Asparagina
- **NIB1:** *Nuclear Isolation Buffer 1* (Tampón de aislamiento nuclear)
- **o.n.:** *overnight* (toda la noche)
- **PKA:** Proteína quinasa A
- **PBS:** *Phosphate Buffered Saline* (Tampón fosfato salino)
- **PCR:** *Polymerase Chain Reaction* (Reacción en cadena de la polimerasa)
- **Pre-ARNr:** Precursor del Ácido ribonucleico ribosómico
- **Q:** Glutamina
- **qRT-PCR:** *quantitative Reverse transcription polymerase chain reaction* (Reacción en cadena de la ADN polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa)
- **RFP:** *Red Fluorescent Protein* (Proteína fluorescente roja)
- **RNP:** *Ribonucleoparticle* (Ribonucleopartícula)
- **SDS:** Dodecil sulfato de sodio
- **scaRNP:** *specific Cajal body ribonucleoparticle* (Ribonucleopartícula específica del cuerpo de Cajal)
- **snRNA:** *small nuclear Ribonucleic Acid* (Ácido ribonucleico pequeño nuclear)
- **snoRNA:** *small nucleolar Ribonucleic Acid* (Ácido ribonucleico pequeño nucleolar)
- **snoRNP:** *small nucleolar ribonucleoparticle* (Ribonucleopartícula pequeña nucleolar)
- **WT:** *Wild type* (Fenotipo silvestre)
- **X-DC:** *X-linked Dyskeratosis Congenita* (Disqueratosis Congénita ligada al cromosoma X)

INTRODUCCIÓN

1. *Dictyostelium discoideum*

1.1. Filogenia

Dictyostelium discoideum es una ameba eucariota, haploide y de vida libre, con un tamaño de entre 10 y 20 μm . Vive de forma natural en el suelo donde se alimenta de bacterias y levaduras por fagocitosis. Crece como células separadas e independientes pero éstas son capaces de interactuar para formar un cuerpo fructífero con un soro en la parte superior que alberga un amplio número de esporas que aseguran la supervivencia de la especie. Esta estructura multicelular se forma cuando existen condiciones adversas en el ambiente como es la ausencia de alimento, por lo que es un organismo que está en la frontera entre lo unicelular y lo pluricelular.

Los estudios filogenéticos y la secuencia completa de su genoma han permitido fijar la aparición del grupo *Dictyostelida* al que pertenece *D. discoideum* hace 500 millones de años [1] y clasificarlo dentro del grupo monofilético *Eumycetozoa* [2], compartiendo características con plantas, metazoos y hongos. El grupo al que pertenece *D. discoideum* se separó después de la división de las plantas y antes de la división de metazoos y hongos (**Figura 1**).

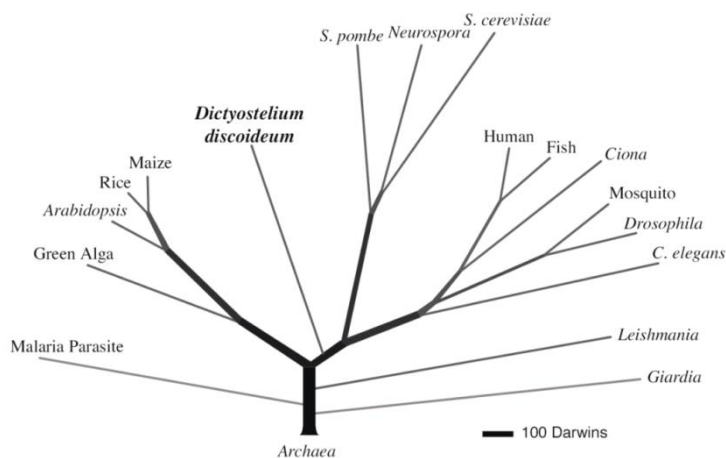


Figura 1. Filogenia eucariota basada en estudios de proteómica. Se analizaron 5279 proteínas ortólogas de 17 especies eucariotas diferentes. La distancia evolutiva se da en Darwin, donde 1 darwin es 1/2000 la divergencia entre *S. cerevisiae* y humano. Imagen extraída de [2]

Dictyostelium discoideum está reconocido por el *National Institute of Health* (NIH) como organismo modelo. Al presentar dos ciclos de vida, unicelular y multicelular, permite estudiar un amplio abanico de procesos implicados en motilidad, agregación, diferenciación y morfogénesis, entre otros, los cuales no están presentes en otros organismos modelo más simples como *S. cerevisiae*.

1.2. Genoma y proteoma

Dictyostelium discoideum es un importante y poderoso modelo para el análisis de la función génica. Su genoma, secuenciado en el año 2005 [2] presenta un tamaño de aproximadamente 34 Mb, siete veces más grande que el de *E. coli*. Está dividido en 6 cromosomas, con un rango en tamaño desde las 4 a las 7 Mb, que codifican para aproximadamente 12500 proteínas. El genoma es compacto, con regiones intergénicas cortas y con pocos intrones, donde aproximadamente el 60% del genoma completo se traduce a proteínas. Presenta un porcentaje elevado de adeninas y timinas, aproximadamente el 77%. El ADN mitocondrial está compuesto por ADN circular de doble cadena de 56 Kb, más extenso que el humano (17 Kb). *D. discoideum* presenta un elemento de ADN ribosomal (ADNr) palindrómico y lineal de 85 kb compuesto de dos unidades transcripcionales de ARNr separadas por un espaciador no transcribible de 50 kb [3] Los ARN ribosomales 5s, 17s y 26s son transcritos a partir de este elemento del que se estima que existe unas 100 copias por núcleo [2].

El genoma de *Dictyostelium discoideum* posee miles de microsatélites con repeticiones de tripletes en los genes, que codifican para largos tramos de un único aminoácido [2]. En humanos algunos casos de largas repeticiones provocan patologías como la enfermedad de Huntington [4], pero parece que *D. discoideum* presenta mecanismos de protección frente a estas repeticiones. Estas repeticiones codifican para unos pocos aminoácidos, especialmente asparagina (N) y glutamina (Q) pero también treonina (T) y serina (S), sugiriendo que las repeticiones de otros aminoácidos pueden ser eliminadas por selección [4]. Estos cuatro aminoácidos son polares y no hidrofóbicos y deben por ello formar un bucle o lazo hacia fuera de la proteína sin alterar su estructura interna. Además estas repeticiones tienden a ocurrir en genes con bajos niveles de expresión y altas tasas de cambio en sitios sinónimos lo que lleva a pensar que no están fuertemente seleccionados [5]. Categorías GO de proteínas quinasas, quinasas lipídicas, factores de transcripción, ARN helicasas y componentes del espliceosoma están enriquecidas en largas repeticiones de Q y N [2].

1.3. Ciclo de vida

1.3.1 Fase vegetativa. Estado unicelular

Dictyostelium discoideum se divide por fisión binaria simple cada 8-10 horas y se alimenta por fagocitosis de diversas especies de levaduras y bacterias pudiendo

consumir hasta 300 bacterias por hora. Se ha utilizado para estudiar las interacciones patógeno-huésped, como por ejemplo la que ocurre en los alvéolos pulmonares entre los macrófagos y *Legionella pneumoniae* [6]. La fagocitosis implica en primer lugar la detección del ácido fólico emitido por las bacterias, que actúa como quimioatrayente, el reconocimiento de la bacteria por receptores de membrana formando el fagosoma que se fusionará con el lisosoma donde se digerirá el microorganismo ingerido [7]. En cultivos líquidos, las cepas axénicas adquieren los nutrientes mediante pinocitosis y macropinocitosis, englobando grandes volúmenes de medio de manera inespecífica [8].

1.3.2 Ciclo pluricelular

Dictyostelium discoideum ha desarrollado un mecanismo asociativo que le permite sobrevivir en condiciones desfavorables como es la ausencia de alimento en un medio tan hostil como es el suelo, formando un cuerpo multicelular. Este mecanismo que generará un organismo multicelular difiere radicalmente de las etapas tempranas de la embriogénesis de los individuos del reino *Metazoa* dependientes de la proliferación celular. Sin embargo los procesos que subyacen dependen de la comunicación célula-célula tanto en *Dictyostelium discoideum* como en metazoos. Procesos básicos del desarrollo como la diferenciación celular, establecimiento de patrones, la expresión de genes inducida por estímulos y la coordinación de los tipos celulares son comunes entre *D. discoideum* y los metazoos [9, 10].

1.3.2.1 Agregación

Dictyostelium discoideum secreta al medio extracelular una proteína llamada PSF (del inglés, *PreStarvation Factor*) en caso de no haber suficiente alimento, siendo una sonda para testar la relación entre el número de células y el de bacterias [11]. Posteriormente se libera el factor CMF (del inglés, *Conditionated Medium Factor*) que detecta la densidad celular. Ambos condicionantes, ayuno y densidad celular son muy importantes para la agregación [12]. Estos factores a su vez inducen la expresión de genes esenciales para la entrada en la etapa de desarrollo como son los componentes de señalización del AMPc y las proteínas de adhesión. También inducen el silenciamiento de los genes de crecimiento [12-16].

Al comenzar la agregación, el AMPc secretado por las células en ayuno se une al receptor de membrana cAR1 del tipo 7 TM (del inglés, *Seven-transmembrane protein*) y

se desencadena una cascada de transducción de la señal que se inicia con la disociación de la proteína G heterotrimérica en dos complejos $G_{\alpha 2}$ y $\beta\gamma$. El segundo activa indirectamente la adenilato ciclasa (ACA) que transforma el adenosín monofosfato (AMP) en AMPc. El gen que codifica para ACA (*acaA*) se transcribe a partir de tres promotores diferentes que son activos en diferentes etapas del desarrollo [17, 18]. Parte del AMPc se libera al exterior como agente quimiotáctico y parte actúa como segundo mensajero intracelular activando la proteína quinasa A dependiente de AMPc (PKA) que regula la transcripción génica. La subunidad $G_{\alpha 2}$ activa la ruta AKT/PKB provocando cambios citoesqueléticos necesarios para la agregación [19]. Cuando una célula comienza a secretar AMPc las amebas del entorno responden polarizándose y orientándose hacia la fuente de AMPc, que se convertirá en el centro de agregación permitiendo que se forme un montículo (del inglés, *mound*) rodeado de una matriz extracelular de polisacáridos y celulosa (Figura 2).

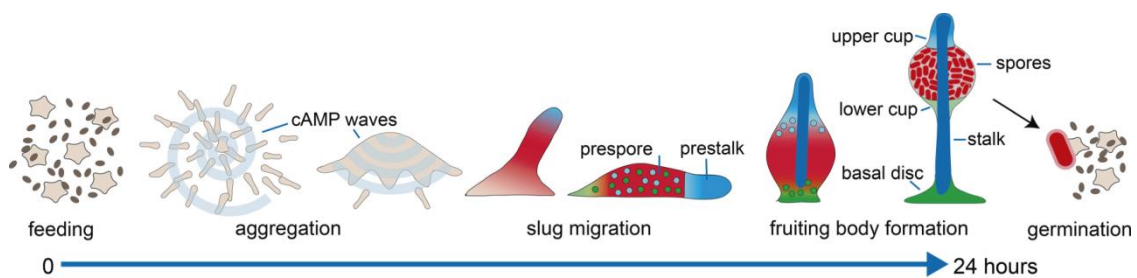


Figura 2. Ciclo de desarrollo de *Dictyostelium discoideum*. La mayoría de su vida permanece en el ciclo vegetativo alimentándose de bacterias en el suelo, y periódicamente se divide por mitosis. Cuando la comida escasea se inicia el ciclo social donde las amebas se agregan por miles vía pulsos de AMPc para formar una especie de babosa (del inglés, *slug*), con capacidad de movimiento, el cual se mueve hacia la luz. En último término forman un cuerpo fructífero en el cuál alrededor de un 20% de las células mueren para levantar la masa de células restantes hasta un lugar mejor para la esporulación y posterior dispersión. Las esporas germinarán en presencia de bacterias. Ver el texto para mayor detalle. Imagen extraída de [20].

Es muy importante que la síntesis de AMPc se produzca de manera controlada y pulsátil de tal forma que las células se puedan orientar hacia la fuente secretora. Para ello el AMPc extracelular ha de ser degradado por la enzima fosfodiesterasa extracelular (PDE), así la señal transducida por cAR1 disminuye, lo que reduce los niveles de AMPc sintetizados por ACA. Con estos ciclos pulsátiles las células quedan polarizadas,

moviéndose en forma de hileras denominadas “*streams*” hacia el centro de agregación. La **figura 2** muestra el ciclo de desarrollo de *D. discoideum*.

Hasta las 4-6 horas de desarrollo, las células pueden dar marcha atrás y volver al estado vegetativo si se les suministra alimento, pero una vez sobrepasado el punto de no retorno las células adquieren un compromiso de desarrollo [21].

1.3.2.2 Diferenciación celular

Las células que inicialmente son idénticas, comienzan a expresar marcadores específicos desde la fase de agregación, distribuyéndose de forma dispersa en el *mound* las células que darán lugar a las esporas (células pre-espora) y las que darán lugar al tallo (células pre-tallo) [22, 23]. Posteriormente, las células pre-tallo migran a la zona apical del *mound*, donde forman el *tip* u organizador que se encargará de regular todo un abanico de señales para el desarrollo. A continuación, el agregado forma una estructura llamada *finger*, que dependiendo de las condiciones del medio puede dar la fase de *slug* o babosa con capacidad migratoria por foto- y termotaxis. Cuando las condiciones son favorables, los *slugs* se detienen y las células pre-tallo situadas en la parte superior del *slug* o los *finger* (20% del total) migran a través de la masa de células pre-espora (80% del total) [22] para hacer contacto con el sustrato (*mexican hat*). Las células pre-tallo, cuyo destino es la muerte celular programada, se elongan y comienzan a formar un tallo definido para que la masa celular pre-espora ascienda (**Figura 2**). Las células pre-tallo en el *slug* se subdividen en varias poblaciones denominadas pstA, pstB, pstO y pstAB (**Figura 3**). Se nominan de esta forma debido a la actividad de las regiones promotoras de dos genes: *ecmA* y *ecmB* (del inglés, *extracellular matrix protein A* y *B*) y dan lugar a distintas estructuras de sostén del cuerpo fructífero. Cuando la masa de células pre-espora ha migrado a la parte superior del tallo se diferencian para formar las esporas. Estas formas de resistencia se dispersan por el medio y pueden germinar para dar lugar a nuevas amebas en condiciones ambientales favorables, cerrando el ciclo biológico.

El proceso de morfogénesis y diferenciación celular está coordinado por señales extracelulares. La diferenciación de las células pre-espora requiere la activación de la proteína quinasa GskA activada por AMPc [9, 10]. El AMPc tiene un papel muy importante en la culminación secretándose de forma local en el *tip* activando la proteína PKA [9, 10]. Para la diferenciación de las células tallo es muy importante el morfógeno DIF-1 (del inglés, *Differentiation Inducing Factor 1*) secretado por las células pre-espora

[24]. Los péptidos SDF-1 y SDF-2 (del inglés, *Spore Differentiation Factors*) se necesitan para el encapsulamiento de las esporas y se requiere la secreción de una matriz extracelular formada por una mezcla celulo-proteica. Estas estructuras requieren de una semana aproximadamente para madurar y ser resistentes al calor y a pH extremos así como a otras situaciones de estrés [25].

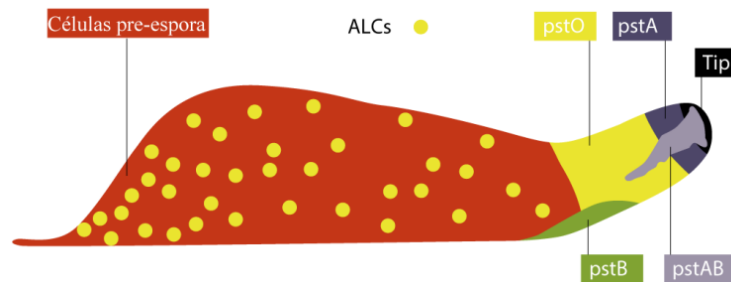


Figura 3. Distribución de células pre-tallo y pre-espora en la fase de slug de *D. discoideum*. La población pre-espora está representada en rojo, siendo aproximadamente el 80% del total de células que componen el slug. En amarillo, las células pstO y las ALC (del inglés, *anterior like-cells*) dispersas en la masa pre-espora. En morado, la población pstA y dentro de ésta, en negro, la región organizadora o tip. En lila y atravesando la población pstA y pstO en forma de cono, la población pstAB. Modificado de [23].

2. Telómeros

Los cromosomas eucariotas están protegidos en sus extremos por unas estructuras nucleo-proteicas especializadas denominadas telómeros, los cuáles son cruciales para el mantenimiento de la integridad genómica. Los telómeros en la mayoría de los eucariotas están formados por ADN repetitivo cuya estructura varía considerablemente entre diferentes especies. El ciliado *Oxytricha nova* presenta unas 4-5 repeticiones de G₄T₄, *Saccharomyces cerevisiae* unas 350-500 pb de repeticiones y los mamíferos un número variable de repeticiones, desde las 10-15 kb del humano hasta las 20-50 kb en ciertas especies de ratón y rata [26]. El ADN telomérico contiene una cadena rica en guanina (en humano, 5'-TTAGGG-3') y su cadena complementaria, llamadas hebra-G y hebra-C respectivamente. El extremo 3' de la hebra-G se extiende para formar una hebra única llamada cola-G [27]. Esta cola invade la hebra C hibridando con ella, para formar una estructura llamada lazo o bucle-t [28]. Se forma una segunda subestructura que implica al saliente monocatenario 3' que invade el dúplex telomérico proximal, provocando un desplazamiento o bucle-D (del inglés, *D-loop*) [28] (Figura 4). Las funciones de la

cola-G son servir como cebador para la telomerasa y para que se puedan unir las proteínas específicas de los telómeros [26].

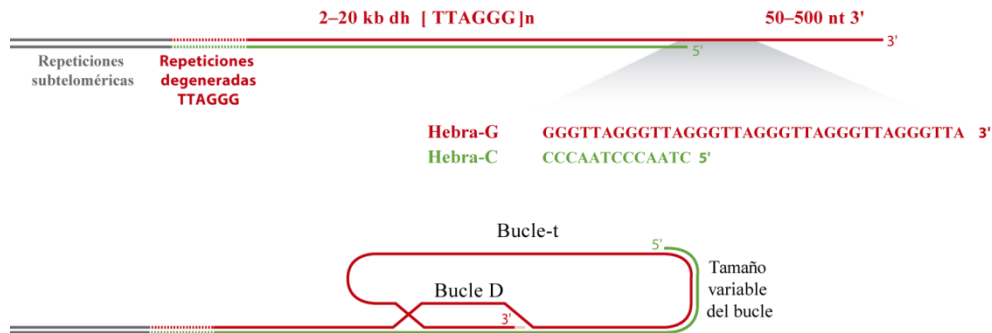


Figura 4. Estructura de los telómeros humanos. Los extremos de los cromosomas humanos finalizan en una concatenación de repeticiones TTAGGG que varía en tamaño. Próximo a las repeticiones teloméricas existe un segmento de repeticiones degeneradas y elementos repetitivos subteloméricos. El final del telómero contiene una larga hebra-G desapareada. En la parte inferior se muestra cómo se resuelve el desapareamiento formándose el bucle-t y el bucle D. Modificado de [26].

Existen casos en el reino vegetal y animal en el que los telómeros de ciertas especies no siguen el patrón habitual descrito anteriormente. Dentro del reino *Plantae*, por ejemplo existe una divergencia filogenética en el Orden *Asparagales* asociada con cambios en las secuencias teloméricas. La divergencia más importante se encuentra en los individuos del género *Allium* (*A. cepa* y *A. fistulosum*). Estas especies presentan una nueva secuencia telomérica, desconocida hasta ahora, de carácter repetitivo del tipo (CTCGGTTATGGG) n y que a su vez es sinterizada por la telomerasa [29].

Otro caso que se escapa de la tónica general es el de *Drosophila melanogaster*, la cual se aleja del modelo de secuencias pentaméricas (TTAGG) n presente en dípteros. *Drosophila* presenta elementos móviles denominados retrotransposones del tipo no-LTR, llamados Het-A y TART. Estos se disponen en tándem como se muestra en la **figura 5**. Het-A tiene un tamaño de seis kilobases y pertenece a una familia de retrotransposones poliadenilados del tipo LINE (del inglés, *Long Interspersed Element*) y codifica para la proteína Gag implicada en la localización del retrotransposón en el cromosoma. TART tiene un tamaño de cinco kilobases y codifica para las proteínas Gag y Pol con dominio retrotranscriptasa y dominio endonucleasa [30].

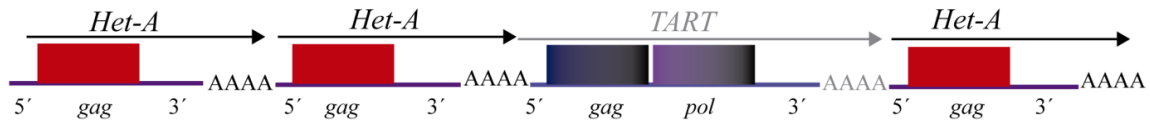


Figura 5. Representación esquemática de la estructura telomérica de *Drosophila*. Las flechas encima de los retrotransposones indican la dirección 5'-3' de cada elemento. 5' y 3' indican regiones no traducibles. AAAA indica la característica poliA de los retrotransposones no-LTR. gag y pol indican los genes gag y pol. Modificado de [30].

En el caso de *Dictyostelium discoideum*, no se han encontrado repeticiones de oligonucleótidos a diferencia de otras especies evolutivamente cercanas como son las amebas *Dictyostelium fasciculatum* y *Polysphondylium pallidum* que presentan telómeros eucariotas normales (**Figura 6**).

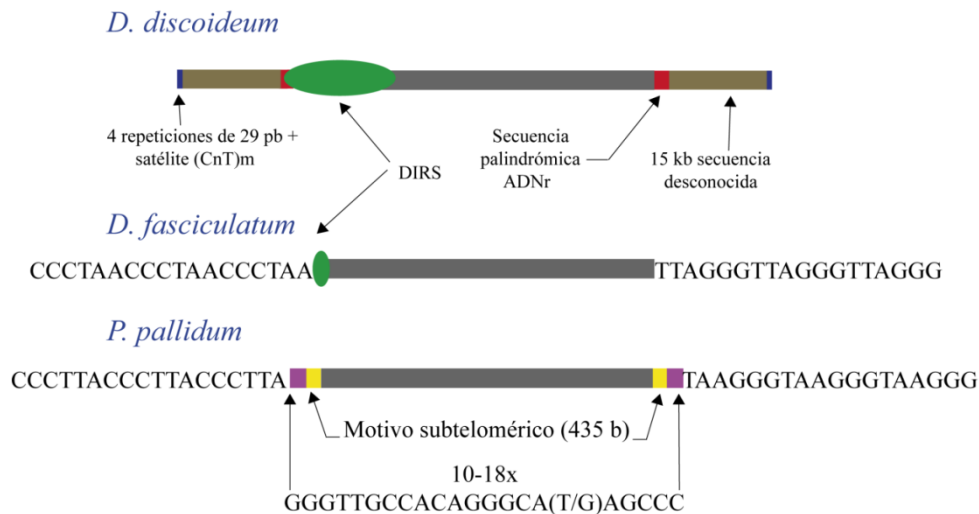


Figura 6. Estructura genómica de las amebas *D. discoideum*, *D. fasciculatum* y *P. pallidum*. DIRS hace referencia a transposones que actúan en calidad de centrómeros en *D. discoideum* y *D. fasciculatum*. En *P. pallidum* se muestra el polimorfismo específico de secuencia entre paréntesis, indicándose el número de repeticiones observadas en la parte superior.

La secuenciación del genoma de *D. discoideum* indica que varios cromosomas terminan en las mismas secuencias encontradas en los elementos de ADNr extracromosómicos [2]. Debido a que las secuencias terminales de este elemento son altamente repetitivas ha sido imposible alinearlas debidamente para componer una secuencia telomérica concreta [2]. Estudios preliminares demostraron que existía heterogeneidad en los extremos del cromosoma ribosomal de *D. discoideum*. Esta región está compuesta en su parte más proximal por una región de cuatro duplicaciones en tándem idénticas de 29 pb y en la parte distal por una secuencia satélite irregular con la siguiente fórmula $[C_nT]_m$.

donde $-n-$ varía entre 1 y 8, mientras que $-m-$ varía entre 18 y 34. Esta secuencia es responsable de la heterogeneidad [31].

3. Telomerasa

Independientemente de la secuencia telomérica particular que tenga cada especie y debido a las propiedades intrínsecas que subyacen al mecanismo de replicación del ADN, los telómeros se acortan en cada división celular [32]. Esto se debe a que al eliminarse el cebador de los fragmentos de Okazaki del extremo 5' de la cadena retardada se produce un hueco que no puede ser rellenado por la ADN polimerasa. Este problema conduce a que los telómeros se acorten entre 50 y 100 nucleótidos en cada ciclo replicativo [33] (**Figura 7**).

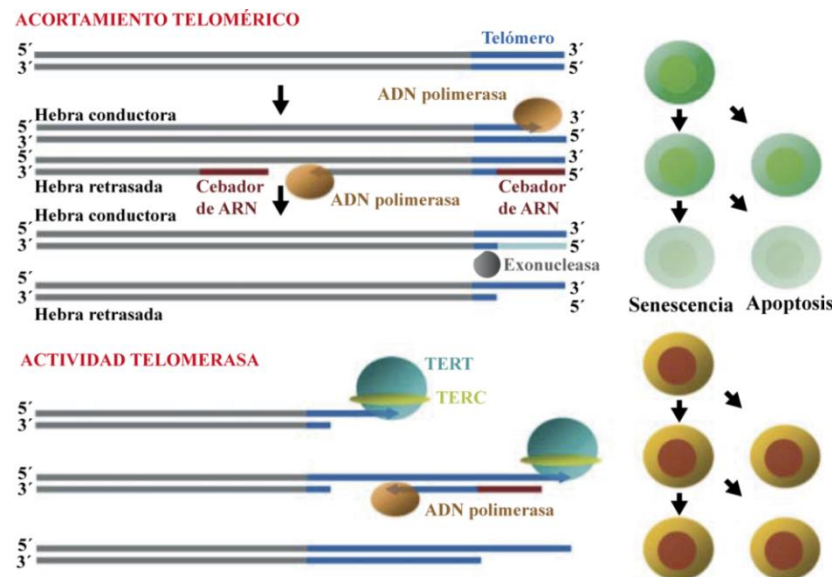


Figura 7. Modelo de acortamiento telomérico y actividad telomerasa. Se crea un saliente en 3' por la síntesis de la hebra retrasada después de la escisión del cebador de ARN dando lugar a un telómero más corto. Después de un cierto número de divisiones, los telómeros alcanzarían un nivel de acortamiento crítico y se induciría la senescencia celular y la apoptosis. El mantenimiento de los telómeros vía telomerasa consiste en que la proteína TERT y la subunidad de ARN, TERC, los extienden añadiendo repeticiones teloméricas en la dirección 3'. La ADN polimerasa puede entonces sintetizar la hebra retardada. Modificado de [34].

En ausencia de telómeros o cuando estos son muy cortos, los extremos cromosómicos son reconocidos por la célula como ADN dañado y son fusionados con otros extremos cromosómicos resultando en la reorganización y la fusión de los cromosomas e induciendo senescencia celular o apoptosis [35].

Atendiendo a su estructura, el polipéptido puede ser subdividido en tres dominios: el dominio N-terminal llamado TEN (del inglés, *Telomerase Essential N-terminal*), el dominio de unión al ARN, TRBD (del inglés, *TERT RNA-binding domain*) y el dominio retrotranscriptasa [46].

En el caso de *D. discoideum* existe una inserción de poli-asparaginas en la proteína Tert, la cual divide el dominio retrotranscriptasa de la proteína en dos mitades. Los tramos de poli-asparaginas, al igual que los de poli-glutamina, como se mencionaba en el apartado “genoma y proteoma” son características comunes en *D. discoideum* ya que son tolerados y generalmente no interrumpen dominios funcionales. Todavía no está claro si la existencia de este tramo tiene consecuencias funcionales en la proteína Tert de *D. discoideum* [47].

La expresión de TERT está altamente regulada y se produce principalmente en células germinales, células troncales y en algunos tipos de células del sistema inmune las cuales tienen altas necesidades proliferativas. En contraste, los tejidos somáticos presentan la expresión de TERT inhibida [48], aunque el silenciamiento de este gen difiere entre organismos ya que, por ejemplo, la actividad y la expresión de TERT se ha conseguido detectar en tejidos somáticos de ratón [49].

En plantas, la telomerasa no está silenciada durante la embriogénesis y permanece activa en organismos y tejidos que contienen meristemos como el ápice caulinar y el ápice radicular. La telomerasa sólo se silencia en órganos terminales diferenciados como pueden ser las hojas maduras. Sin embargo, el silenciamiento de ésta en células diferenciadas puede ser reversible, por ejemplo, al inicio de la división celular durante la regeneración de la planta desde células del mesófilo foliar, lo que refleja el carácter totipotente de las células de las plantas [50].

4. *Alternative Lengthening of Telomeres (ALT)*

Se ha descrito un mecanismo independiente de actividad telomerasa que permite a la célula mantener los telómeros mediante fenómenos de recombinación, llamado ALT (del inglés, *Alternative Lengthening of Telomeres*).

Por ejemplo, las células cancerosas sortean el problema del acortamiento telomérico producido por el problema replicativo explicado anteriormente adquiriendo un

mecanismo de mantenimiento de los telómeros que les confiere proliferación ilimitada [51]. En un 15% de los tumores la extensión de los telómeros es gracias a la vía ALT, vía que opera a través de los mecanismos de reparación del ADN y de recombinación ya mencionados [52]. En levaduras y ratones, los supervivientes aislados de la delección bien de la retrotranscriptasa o del ARN asociado adquieren alargamiento lineal telomérico en los extremos por mecanismos recombinatorios [53-55].

4.1 Características

4.1.1 Tamaño telomérico heterogéneo

Las células que presentan mecanismo ALT tienen como característica principal que sus telómeros son largos y heterogéneos (5 kb-50 kb) a diferencia de células telomerasa-positiva que presentan telómeros relativamente homogéneos con un tamaño de aproximadamente 10 kb [56, 57] (Figura 9).

La conducta tan dinámica de los telómeros en células que presentan el fenómeno ALT sugiere que exista recombinación homóloga entre telómeros [58, 59]. Por el contrario, no existen elevadas tasas de recombinación intracromosomales y sólo se da esta recombinación en *loci* con secuencias repetitivas como telómeros y minisatélites [60, 61].

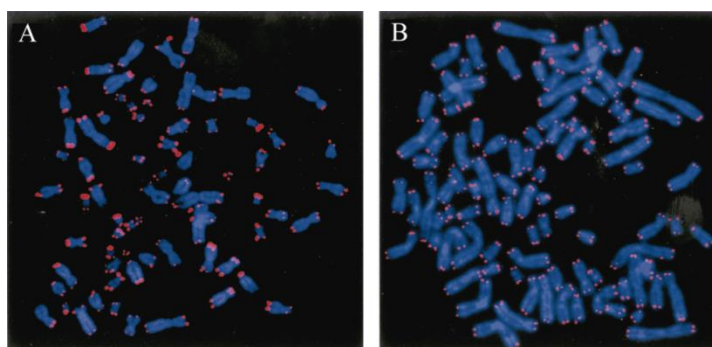


Figura 9. Visualización de los telómeros en células ALT (A) y células telomerasa positiva (B) por hibridación *in situ* fluorescente (FISH). Nótese el tamaño tan heterogéneo que presentan los telómeros de las células ALT. Modificado de [62].

4.1.2 ALT-associated Promyelocytic leukaemia (PML) Bodies (APBs)

Los cuerpos nucleares APBs denominados cuerpos promielocíticos asociados con el ALT (del inglés, *ALT-associated promyelocytic leukaemia (PML) bodies*) son característicos de células con mecanismo ALT. Son estructuras dinámicas cuyo número, tamaño, morfología, constituyentes y función varían con el ciclo celular, el estado de la célula y las condiciones externas. Los procesos en los que están implicados estos

cuerpos son supresión tumoral, regulación del ciclo celular, apoptosis, senescencia, respuestas inflamatorias e inmunes, presentación de antígeno, plegamiento y degradación proteica y diferenciación [62]. Estos APBs se diferencian de otros cuerpos nucleares promielocíticos (PNBs) (del inglés, *PML nuclear bodies*) por su contenido, incluyendo ADN telomérico y proteínas de unión a telómero (TRF1 y TRF2) [63] (**Figura 10**). También contienen una serie de proteínas implicadas en recombinación y replicación del ADN como RAD51, RAD52, RPA, MRE11, RAD50, NBS1, BLM y WRN [63-67]. Los APBs tienen apariencia de estructura de disco o anillo con un diámetro de aproximadamente entre 0,1 y 1 μm [68] (**Figura 10**).

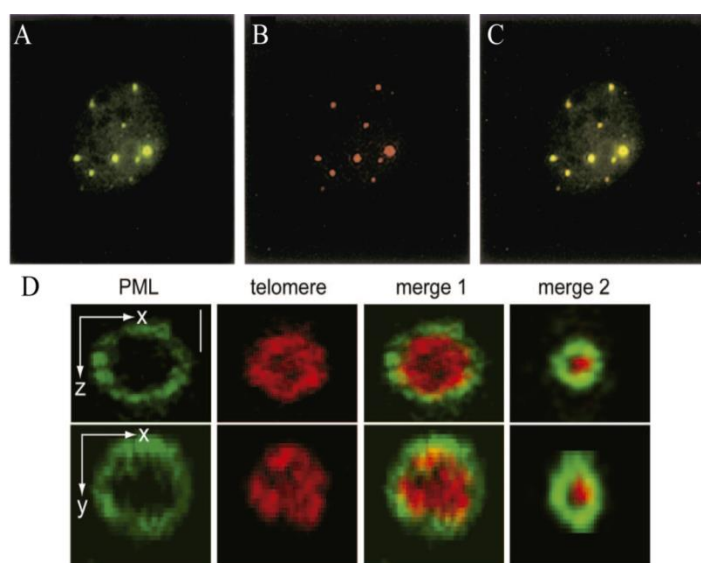


Figura 10. APBs en una línea celular humana con mecanismo ALT. Las imágenes A y B muestran una inmunohistoquímica contra TRF1 y PML. La imagen C muestra la colocalización de ambos en agregados nucleares. Modificado del [62]. La figura D muestra una imagen obtenida de un microscopio 4Pi de fluorescencia de dos colores de alta resolución de los componentes de un APB (proteína PML y fragmento telomérico). Imagen obtenida de [69].

En base a su composición es posible que los APBs puedan concentrar o modificar proteínas requeridas para el mecanismo ALT. Es posible que también estén implicados en eliminar productos de los procesos ALT, ya que existe alguna evidencia de que podrían ser sitios de proteólisis intranuclear [70]. En cualquier caso la presencia de estos cuerpos se utilizan como marcadores de ALT.

La adición de bromodeoxiuridina (BrdU), análogo de timidina, puede observarse en los APBs [71]. Esta síntesis de nuevo ADN en los APBs puede ser suprimida por inhibidores de ATM y ATR [72], los cuáles son miembros de la vía vinculada con la quinasa relacionada con la fosfoinositido-3-quinasa (PIKK), muy importante para la activación de la respuesta al daño en el ADN (del inglés, *DNA Damage Response*, DDR). Esto indica que la vía ALT debe de estar relacionada con la de señalización al daño. Los telómeros de células ALT colocalizan con marcadores para DDR, por

ejemplo, γ H2AX, 53BP1, el complejo RAD9-RAD1-HUS1 (9-1-1) y su cargador RAD17 [72, 73]. Ciertos estudios indican que los fragmentos de ADN telomérico presentes en los APBs son extremos cromosómicos, así éstos potenciarían la recombinación homóloga entre telómeros ya que los extremos cromosómicos se agruparían en los APBs [74]. Los APBs contienen predominantemente repeticiones teloméricas extracromosomales (del inglés, *ExtraChromosomal Telomere Repeat*, ECTR) [75], explicadas a continuación.

4.1.3 Repeticiones teloméricas extracromosomales

Las células con mecanismo ALT también presentan una tercera característica importante que se suma al tamaño heterogéneo de los telómeros y a la presencia de APBs que es la presencia de ADN telomérico [76] lineal y de doble cadena, aislado de la fracción soluble de extractos celulares y que no se observa en células telomerasa positiva [77]. Las ECTRs pueden ser utilizadas para alargar los telómeros mediante reacciones que permitan la unión en los extremos o por recombinación homóloga [71]. También se han descrito formas circulares similares a la forma circular del telómero, círculo-t [78]. De hecho, cuando se introducen círculos-t en células ALT humanas, este ADN es copiado en los extremos cromosómicos para formar repeticiones en tándem [79-81]. Estos círculos también se utilizan como marcadores de células ALT.

Más evidencias de que la recombinación puede ser utilizada para elongar telómeros bajo ciertas circunstancias provienen de experimentos en los cuales se introduce en levadura plásmidos lineales conteniendo las repeticiones terminales presentes en *Tetrahymena* $(C_4A_2)_n$ o en *Oxytricha* $(C_4A_4)_n$. Cuando se disponen en la orientación natural con respecto a los extremos, las secuencias terminales de los plásmidos son reconocidas como teloméricas por las células transformadas y son añadidas a los extremos cromosómicos [82].

Células troncales embrionarias supervivientes de ratón, *knock-out* para *Terc* mantienen sus telómeros de una manera independiente de telomerasa. Se observaron tanto secuencias teloméricas como no teloméricas en los extremos de los cromosomas [83]. De hecho cuando se incorporaron secuencias de ADN teloméricas ectópicas, éstas se unieron a la mayoría de los cromosomas [84, 85].

En *D. discoideum* la presencia de unas 100 copias del elemento extracromosómico que contiene el ADN_r, podría estar actuando como sustrato para el mantenimiento telomérico de los cromosomas y de sí mismo por fenómenos de recombinación homóloga.

4.2 Proteínas implicadas en ALT

4.2.1 Complejo MRN

Este complejo incluye a las proteínas MRE11, RAD50 y NBS1 que funcionan en las etapas iniciales de la recombinación homóloga y en la reparación de roturas de doble cadena de ADN (del inglés, DSB: *Double Strand Breaks*). La eliminación de cualquiera de los genes que codifican para estas proteínas induce el acortamiento telomérico en células con mecanismo ALT [86-88]. MRN es un complejo muy importante para que se pueda dar la formación y el ensamblaje de los APBs [89].

4.2.2 TRF2 y complejo shelterina

TRF2 es una proteína del complejo shelterina que se une al ADN telomérico de doble cadena. Defectos en esta proteína estimulan la fusión cromosómica entre telómeros en células telomerasa-positivas [90]. La formación de APBs está afectada si no existen TRF1, TRF2, TIN2 y RAP1 [89].

4.2.3 Helicasas de ADN semejantes a RecQ

Las helicasas de la familia RecQ actúan sobre estructuras atípicas de ADN, como las formas intermedias presentes en la recombinación homóloga, los sitios bloqueados en la horquilla de replicación y la estructura de cuarteto-G de los telómeros. Mutaciones en cualquiera de los tres genes que codifican para este tipo de helicasas, BLM (síndrome de Bloom), WRN (síndrome de Werner) o RECQL4 (síndrome de Rothmund-Thomson) provoca anormalidades cromosómicas y envejecimiento prematuro. Específicamente, la eliminación de BLM induce un rápido acortamiento telomérico y la inhibición del crecimiento ALT [91, 92].

4.2.4 Otras proteínas implicadas en ALT

Se ha descrito la participación en este proceso de proteínas implicadas en la resolución de estructuras complejas del ADN [93, 94], proteínas necesarias para la replicación del ADN [95, 96] y complejos de sumoilación y ubiquitinación. Entre estas últimas cabe destacar el complejo SMC5/6 [87], el cuál es uno de los complejos del SMC (del inglés, *Structural Maintenance of Chromosome*). Participa en la reparación del ADN y en la DDR. El complejo incluye a MMS21, una E3 SUMO ligasa (subunidad no-SMC), SMC5/6 y MMS21 los cuales son componentes de APBs. El *knock-down* de cada uno de estos genes provoca un reducido número de APBs en la célula. El *knock-down* de *SMC5* o *MMS21* en células ALT induce acortamiento telomérico, pérdida telomérica y supresión del crecimiento celular.

5. Disquerina

La disquerina, forma parte del complejo telomerasa y es codificada en el gen *DKC1* como se ha descrito anteriormente [97]. El gen homólogo *dkc1* o *nola4* (del inglés, *NucleOLar protein family A, member 4*) codifica una proteína nucleolar de 60 kDa en *D. discoideum*. La secuencia presenta un alto grado de conservación filogenética que indica su gran importancia biológica. El gen de levadura *cbf5*, originalmente descrito por codificar para una proteína de unión al centrómero y a los microtubulos [98] fue el primer miembro de esta familia de genes en ser identificado. Posteriormente el ortólogo en mamífero NAP57, fue descubierto en rata, y estudiado por su papel en el transporte núcleo-citoplasma de estructuras pre-ribosomales [99]. Con carácter general la disquerina se une a la caja H/ACA presente en los ARNs nucleolares pequeños (del inglés, *small nucleolar RNA: snoRNA*) y a TR en vertebrados [42]. Los *snoRNAs* actúan como una guía para la pseudouridilación del ARN ribosomal mediada por disquerina, que se abordará más adelante como parte de las funciones extrateloméricas de disquerina. Estos *snoRNAs* contienen dos horquillas de tamaño variable separados por una región monocatenaria que incluye una caja H altamente conservada, seguida de una cola corta que contiene el trinucleótido ACA [100]. Existen tres proteínas diferentes que se asocian con la disquerina (NHP2, GAR1 y NOP10) para formar partículas ribonucleoproteicas [100]. DKC1, NHP2 y NOP10 se asocian estrechamente y están implicados en el mantenimiento de la estabilidad del complejo ribonucleoproteico, mientras que la interacción con GAR1 es lábil y transitoria [101]. Por lo tanto, la

disquerina se requiere para la función del complejo telomerasa siendo esencial para la estabilidad y acumulación nuclear de TR [101] y la pseudouridilación del ARNr, entre otros [102].

6. Disqueratosis congénita

La disqueratosis congénita (DC) es un síndrome asociado con el acortamiento telomérico. Se caracteriza por la presencia en los pacientes de uñas displásicas, pigmentación reticular de la parte superior del pecho y/o cuello y leucoplasia oral, aunque esta triada de síntomas no está presente en todos los pacientes. Los enfermos de DC presentan un riesgo aumentado de padecer fallos o deficiencia de médula ósea, síndrome mielodisplásico o leucemia, tumores sólidos (normalmente carcinoma escamoso de cabeza/cuello o cáncer anogenital) y fibrosis pulmonar [43]. Existen dos variantes en DC que muestran patología nerviosa. Estas variantes son el síndrome de Hoyeraal Hreidarsson donde se produce hipoplasia cerebelar, y el síndrome de Revesz, que cursa con retinopatía exudativa bilateral y calcificaciones intracraneales [103].

La variante de disqueratosis ligada al cromosoma X (X-DC) está causada por mutaciones puntuales en el gen de la disquerina [43, 104]. Otros pacientes presentan mutaciones autosómicas dominantes relacionadas con los genes *TINF2* y *TERC*. Este último puede ser sólo recuperado por la re-expresión de hTR [105]. Además, la DC está relacionada con mutaciones en los genes *ACD*, *RTEL1* y *TERT* de herencia autosómica dominante o recesiva [103]. Finalmente los pacientes pueden presentar mutaciones de carácter exclusivamente autosómico recesivo en los genes *CTC*, *NHP2*, *NOP10*, *PARN* y *WRAP53* [103]. La inestabilidad cromosómica en pacientes con DC aumenta con la edad debido a una disminución de la actividad telomerasa y a un incorrecto mantenimiento de la estructura del telómero. En X-DC los linfoblastos y fibroblastos presentan niveles de hTR reducidos [42] y los telómeros son más cortos que en la población no afectada por la enfermedad de la misma edad que los pacientes. Además del acortamiento telomérico, el daño basal al ADN está elevado y muy potenciado cuando se tratan células de pacientes de DC con citotóxicos [77, 78].

En pacientes con mutaciones en disquerina se desconoce si los efectos derivados de la enfermedad están relacionados con el déficit en la pseudouridinilación de ARNs o se deben únicamente al papel de esta proteína en el mantenimiento de los telómeros.

7. Pseudouridilación

La pseudouridilación es, de los aproximadamente 100 tipos de modificaciones post transcripcionales de los ARNs, la más abundante. La pseudouridina (Ψ) es un isómero de uridina (5-ribosiluracilo) formado a través de una reacción de isomerización [106]. Inicialmente, el puente nitrógeno-carbono (N1-C1') que une la base uracilo al azúcar se rompe. La base liberada es girada 180° a lo largo del eje N3-C6, estableciendo un nuevo puente carbono-carbono (C5-C1') entre la base y el azúcar. Como resultado, la modificación crea un donante extra de puente de hidrógeno en su borde no Watson-Crick, dotando a Ψ de propiedades químicas distintas de las presentes en la uridina y en todos los nucleótidos conocidos (**Figura 11**).

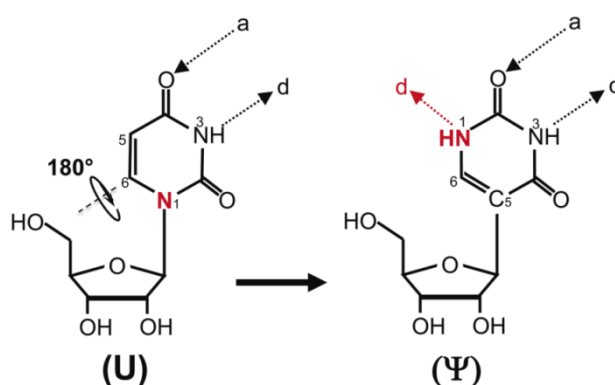


Figura 11. Representación esquemática de la isomerización de uridina (U) a pseudouridina (Ψ). La reacción de isomerización engloba una rotación de 180° de la base a lo largo del eje N3-C6 y de los enlaces C5-C1'. El nitrógeno en posición 1 en uracilo y el hidrógeno extra donador de Ψ están marcados en rojo. Se indican átomos aceptores (a) y donadores (d). Imagen obtenida de [107].

Por abundancia y por su naturaleza altamente conservada, se cree que las Ψ son funcionalmente muy importantes. Se han encontrado Ψ en ARNt [108], en gran abundancia en ARNr [109], en el ARNm y en los espliceosomas [110] (**Tabla 1**).

La pseudouridilación del ARN eucariota, en particular del ARNr y del ARN pequeño nuclear (*snRNA*, del inglés *small nuclear RNA*), es catalizada por ribonucleoproteínas (RNPs) complejas que contienen en el ARN asociado un motivo llamado caja H/ACA [111]. Cada RNP está formada de un único ARN H/ACA y cuatro proteínas comunes que conforman el núcleo de la RNP. Estas son NHP2 (L7Ae en Archaea), GAR1, NOP10, y CBF5 (NAP57 o disquerina en mamíferos, Dkc1 en *Dictyostelium discoideum*) (**Figura 12**). El ARN sirve como guía que une específicamente la uridina y Cbf5 es la pseudouridilasa que cataliza la reacción química de U a ψ . En el proceso de pseudouridilación cada caja H/ACA une el ARN sustrato en una estructura altamente conservada de tipo horquilla-bisagra-horquilla-cola, exponiendo la caja H en la región bisagra y la caja ACA en la región de la cola. Cada horquilla contiene un bucle interno

de cadena única, a veces nominado como bolsillo de pseudouridilación, que es complementario a una secuencia corta y específica en el ARN. Debido al apareamiento de bases entre secuencias complementarias la uridina diana se sitúa en la base del tronco superior de la horquilla y así se lleva a cabo la pseudouridilación (**Figura 12**).

Especie	ARNm		ARNnc
	Contenido	Distribución	
<i>Homo sapiens</i>	ψ/U : ~0.2-0.4% [112, 113]	CDS y 3'UTR [113, 114]	ψ/U en ARNr: ~7-9% [115] 96 sitios de ψ en el ARNr [115] 12 sitios de ψ en el ARNt [116]
<i>Mus musculus</i>	ψ/U : ~0.2-0.6% [112, 113]	CDS y 3'UTR [113]	ψ/U en ARNr: ~7-9% [115] 95 sitios de ψ en el ARNr [115] 12 sitios de ψ en el ARNt [116]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Dato no disponible	CDS [114, 117, 118]	ψ/U en ARNr: ~3% [115] 46 sitios de ψ en el ARNr [115] 16 sitios de ψ en el ARNt [116]

Tabla 1. Abundancia y distribución de ψ en el transcriptoma. Se muestra el porcentaje y la distribución de ψ en el ARN mensajero y en los ARN ribosomal y transferente englobados como ARN no codificantes (ARNnc) de tres especies modelo. CDS: secuencias codificantes, 3'UTR: Región no traducida en 3'.

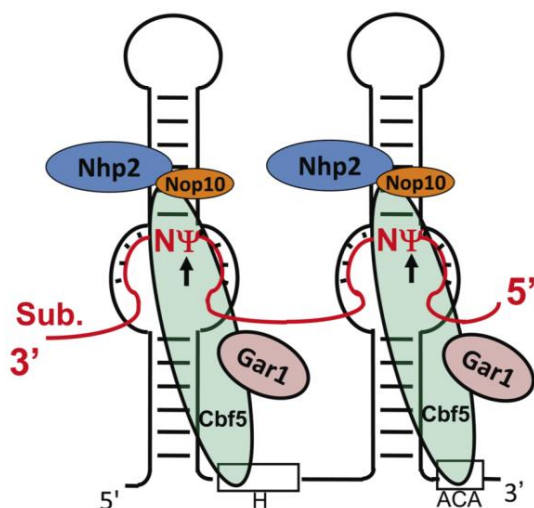


Figura 12. Pseudouridilación catalizada por una RNP eucariota con caja H/ACA. La ribonucleoproteína consta de un ARN guía con estructura de horquilla-bisagra-horquilla-cola (línea negra) y cuatro proteínas: Cbf5, Nhp2, Nop10 y Gar1. El sustrato (línea roja), aparea con las secuencias guía en los bolsillos de pseudouridilación del ARN H/ACA. ψ (rojo) es el nucleótido diana convertido desde uridina, y N (rojo) representa un nucleótido cualquiera. Aunque el ARN H/ACA es una molécula de doble horquilla en eucariotas, la función de las dos es independiente, cada una opera como unidad funcional. Imagen obtenida de [107].

Muchos de los sitios de pseudouridilación están conservados entre especies [110] ya que están agrupados en regiones funcionalmente importantes. Las ψ no se distribuyen aleatoriamente en la estructura secundaria del ARNr [119] (**Figura 13**). Se agrupan principalmente en el centro peptidil transferasa (PTC), el centro decodificante, la región *A-site finger* (ASF) y sitios donde la subunidad ribosomal interactúa [120]. De la misma

forma, las ψ se localizan en las regiones funcionalmente más importantes de los *snRNA* que conforman el espliceosoma [110].

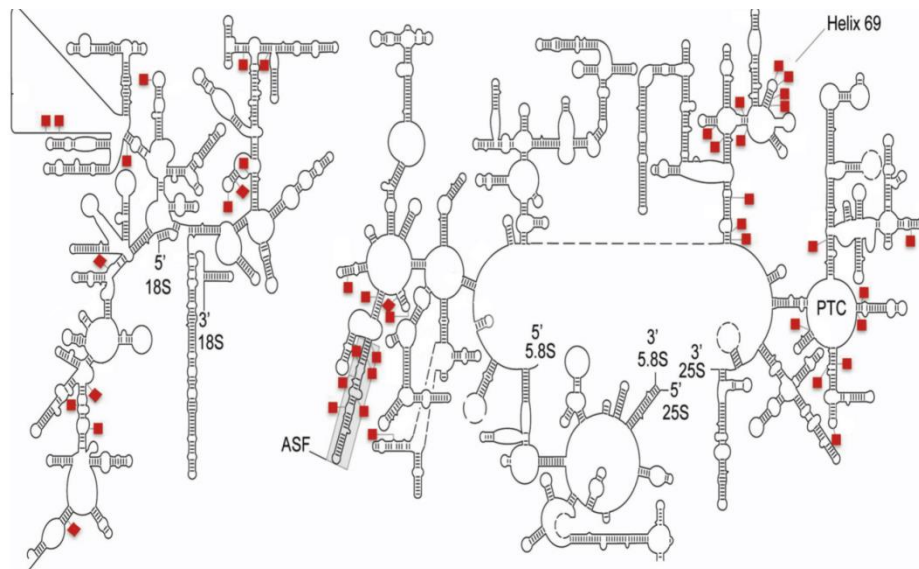


Figura 13. Las ψ se agrupan en regiones importantes del ARNr. Se muestran las estructuras secundarias de los ARNr 18S y 25S-5.8S de levadura. Los cuadrados rojos representan las ψ . Se indican las regiones Hélice- 69, centro peptidil transferasa (PTC) y la región A-site finger (ASF) del ARNr 25S. Imagen obtenida de [107].

Las ψ modifican la estructura del ARN incrementando el apilamiento de bases [121], mejorando el apareamiento entre bases [122] o haciendo más rígido el esqueleto azúcar-fosfato [123]. Existen estudios que han relacionado la pseudouridilación, bien directa o indirectamente con enfermedades. Por ejemplo, un aumento de niveles de ψ oxidada se asocia con enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer o el Parkinson [124].

8. DAÑO AL ADN

Las células de paciente de DC presentan un elevado daño en el ADN. El daño al ADN inicia una cascada de transducción de la señal que conlleva la fosforilación de una serie de moléculas efectoras que inician varios eventos de DDR [125]. Uno de los eventos es la fosforilación de la histona γ H2A.X, dependiente de la aparición DSB. Este hecho promueve el reclutamiento de proteínas implicadas en reparar el ADN y proteínas implicadas en el control del ciclo celular a los sitios dañados [126]. Como otros eucariotas, *D. discoideum* contiene un ortólogo de γ H2AX que es fosforilado en respuesta a DSB durante el crecimiento vegetativo.

OBJETIVOS

1. Caracterizar el extremo del elemento extracromosomal de ADNr de *Dictyostelium discoideum* y su posible extensión por el complejo telomerasa.
2. Indagar la posible implicación de un mecanismo del tipo ALT (*Alternative Lengthening of Telomeres*) en la elongación de los telómeros en *Dictyostelium discoideum*.
3. Desarrollar un modelo celular en *Dictyostelium discoideum* para el estudio de la enfermedad disqueratosis congénita.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Crecimiento

Las células de *Dictyostelium discoideum*, independientemente de la cepa utilizada se crecieron en medio HL5 (14,93 g/L triptona, 7,47 g/L extracto de levadura, 0,37 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,31 g/L KH_2PO_4 , 0,08 M glucosa, 100 unidades de penicilina y 10 mg estreptomicina) en agitación a 180 rpm y 22°C o sobre césped bacteriano de *Klebsiella aerogenes* en placas de SM-agar (10 g/L bacto peptona, 1 g/L extracto de levadura, 10 g/L glucosa, 1 g/L MgSO_4 , 1,9 g/L KH_2PO_4 , 0,6 g/L K_2HPO_4 , 20 g/L agar bacteriológico) [127].

2. Cepas empleadas

La cepa silvestre de *Dictyostelium discoideum* utilizada para la consecución de este trabajo fue AX4 (del inglés *axenically grown strain-4*). Cada mes, se refrescaba la cepa, descongelando nuevas células sobre un césped de bacterias *Klebsiella aerogenes* crecidas sobre placas de SM-agar y posteriormente traspasadas a medio líquido HL5.

A partir de estas células y mediante las transfecciones y selecciones descritas se obtuvieron todas las cepas utilizadas para la elaboración de este trabajo y las cuáles se enumeran a continuación:

AX4/A15::*dkc1*: Cepa AX4 que expresa constitutivamente, bajo el promotor actina 15, la fusión traduccional de la proteína verde fluorescente (GFP) a la región carboxilo terminal de la proteína disquerina (Dkc1).

AX4/*dkc618*::*dkc1*: Cepa AX4 que expresa Dkc1 fusionada a GFP en su extremo carboxilo terminal. A modo de promotor se utilizó el fragmento -618/+1 del gen *dkc1*.

AX4/*dkc618*::*dkc1*#1: Cepa AX4 que expresa Dkc1 fusionada a GFP con la mutación Ile23Thr. Se utilizó el mismo vector que en la cepa AX4/*dkc618*::*dkc1*. En el trabajo también llamado mutante 1.

AX4/*dkc618*::*dkc1*#2: Cepa AX4 que expresa Dkc1 fusionada a GFP con la mutación Thr33Met. Se utilizó el mismo vector que en la cepa AX4/*dkc618*::*dkc1*. En el trabajo también llamado mutante 2.

AX4/dkc618::dkc1#3: Cepa AX4 que expresa Dkc1 fusionada a GFP con la mutación Ser105Gly. Se utilizó el mismo vector que en la cepa AX4/dkc618::dkc1. En el trabajo también llamado mutante 3.

AX4/dkc618::dkc1#4: Cepa AX4 que expresa Dkc1 fusionada a GFP con la mutación Ala337Val. Se utilizó el mismo vector que en la cepa AX4/dkc618::dkc1. En el trabajo también llamado mutante 4.

AX4/A15::mre11: Cepa AX4 que expresa constitutivamente, bajo el promotor actina 15, Mre11 fusionada a GFP en su extremo carboxilo terminal.

AX4/A15::rad51: Cepa AX4 que expresa constitutivamente, bajo el promotor actina 15, Rad51 fusionada a GFP en su extremo carboxilo terminal.

AX4/A15::rad50: Cepa AX4 que expresa constitutivamente, bajo el promotor actina 15, Rad50 fusionada a GFP en su extremo carboxilo terminal.

AX4/A15::dkc1/mre11: Cepa AX4 que expresa constitutivamente, bajo el promotor actina 15, Dkc1 fusionada a GFP en su extremo carboxilo terminal. Expresa también bajo el promotor de actina 6 la proteína Mre11 fusionada a Myc en su extremo carboxilo terminal.

AX4/A15::mre11/rad50: Cepa AX4 que expresa constitutivamente, bajo el promotor actina 15, Rad50 fusionada a GFP en su extremo carboxilo terminal. Expresa también bajo el promotor de actina 6 la proteína Mre11 fusionada a Myc en su extremo carboxilo terminal.

AX4/A15::smc6: Cepa AX4 que expresa constitutivamente, bajo el promotor actina 15, Smc6 fusionada a la proteína roja fluorescente (RFP) en su extremo carboxilo terminal.

tert⁻: Cepa *knock-out* para el gen *tert*. Construida sobre fondo AX4.

Knock-in-dkc1#1: Cepa *knock-in* construida sobre fondo AX4 con la sustitución 203T>C en el gen *dkc1*.

Knock-in-dkc1#2: Cepa *knock-in* construida sobre fondo AX4 con las sustituciones 233C>T y 234T>G en el gen *dkc1*.

3. Estudio del extremo del elemento extracromosomal de ADNr

3.1 Diseño de los oligonucleótidos

Basándonos en dos secuencias publicadas en un artículo de 1981 en las que se describían como parte del extremo del elemento de ADNr extracromosomal en *D. discoideum* [31] diseñamos cuatro oligonucleótidos para determinar si estas eran consecutivas. Dos de estos oligonucleótidos, cuyas secuencias eran reversas entre sí, fueron diseñados en el inicio de la secuencia descrita como proximal y los otros dos se diseñaron de la misma forma en el final de la otra secuencia descrita como distal. En ambos casos se siguió el sentido en el que debía de darse amplificación según el orden predicho de los fragmentos (Tabla 2).

Secuencia proximal	(F1) Sentido 5'-3'	GGTTAGCGGTGGGAATCGAACC
	(F2) Sentido 5'-3'	CCAATCGCCACCCTTAGCTTGG
Secuencia distal	(R1) Antisentido 5'-3'	GAGGGGGGAGGGGGGAGGG
	(R2) Antisentido 5'-3'	CTCCCCCTCCCCCTCCC

Tabla 2. Oligonucleótidos empleados para el estudio del extremo del elemento de ADNr extracromosomal. F: *Forward*, R: *Reverse*.

3.2 Extremo 3' monocatenario

Se incubó de forma independiente 1 µg de ADN genómico de células AX4 con las enzimas nucleasa S1 (Thermo Fisher Scientific. Massachusetts, EE.UU.) y Exonucleasa I (Exo I) (Thermo Fisher) según las indicaciones del fabricante. 100 ng de estas reacciones previamente inactivadas y 100 ng del ADN genómico sin tratar se utilizaron para realizar una PCR (95°C, 10 min; (95°C, 1 min; 58°C, 1 min; 72° 1,5 min) x 30 ciclos) con los oligonucleótidos F1 y R2 descritos en la **tabla 2**. Como control de PCR se utilizó la pareja de oligonucleótidos utilizados en el análisis de los clones *knock-out* de *tert* para el mismo fin (**tabla 6**).

3.2.1 Secuencia

La reacción de PCR obtenida con los oligonucleótidos F1 y R2 del ADN genómico de células AX4 sin tratar se purificó con QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen. Hilden, Alemania), se clonó en el vector p-GEMTeasy (Promega. Wisconsin, EE.UU.). Con la construcción resultante se transformaron bacterias competentes DH5α. El plásmido

obtenido mediante *miniprep* de 9 clones se secuenció y se alineó con el programa MacVector (MacVector. North Carolina, EE.UU.) mediante el alineamiento de secuencia multiple ClustalW.

4. Construcción de vectores

4.1 Vectores utilizados

Todos los vectores utilizados en este trabajo fueron obtenidos del “*Stock Center*” de la *dictybase* (dictybase.org)

pDV-cGFP-cTAP: Vector cuya expresión está dirigida por el promotor de actina 15. Presenta como epítomos GFP y TAP en la zona C-terminal. Posee resistencia a G418. Depositado por la Dra. Pauline Schaap cuyo ID es 326 [128].

pDBsrXP-6xMyc: Vector cuya expresión está dirigida por el promotor de actina 6. Presenta una secuencia en el extremo posterior al sitio múltiple de clonaje de 6 elementos Myc. Posee resistencia a blasticidina. Depositado por el Dr. Wolfgang Nellen cuyo ID es 627 [129].

pDM324: Vector cuya expresión está dirigida por el promotor de actina 15. Presenta como epítopo la proteína roja fluorescente (RFP). Posee resistencia a G418. Depositado por el Dr. Douwe Veltman cuyo ID es 541 [130].

pLPBLP: Vector que contiene un casete de blasticidina flanqueado por sitios loxP para generar múltiples interrupciones en los genes. Posee resistencia a blasticidina. Depositado por el Dr. Jan Faix cuyo ID es 9 [131].

pDEX-NLS-cre: Vector que expresa la enzima recombinasa bajo el promotor de actina 15. Posee resistencia a G418. Depositado por el Dr Jan Faix cuyo ID es 8 [131].

4.2 Construcciones

4.2.1 Vectores de sobreexpresión

Todos los productos de PCR utilizados para la construcción de los diferentes vectores, se originaron a partir de la amplificación del ADN genómico de células AX4 utilizando la enzima “Herculase II fusion” (Agilent technologies. California, EE.UU.)

Los pasos de clonaje intermedios se realizaron en el vector P-GEMTeasy. Los productos de PCR antes de ser purificados con QIAquick® Gel Extraction Kit y clonados en P-GEMTeasy fueron incubados con “Taq DNA Polymerase” (Invitrogen, California, EE.UU) a 72°C durante 20 min lo que incorpora una adenina adicional en cada extremo del amplicón. Esta base es necesaria para la ligación a dicho vector. Todas las transformaciones se realizaron en la cepa bacteriana DH5α de *E. coli* crecidas en medio LB (10 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura, 5 g/L NaCl, pH 7.0) con ampicilina (100 µg/mL).

4.2.1.1 *tert*

El gen *tert* completo (3954 pb) o un fragmento de 1943 pb previo a las múltiples repeticiones que codifican para el fragmento de asparaginas fueron clonados en el vector pDV-cGFP-cTAP. En el segundo caso se amplificó el fragmento con los oligonucleótidos indicados en la **tabla 3**. El oligonucleótido sentido 5′-3′ generó un sitio HindIII. El sitio de restricción del extremo 3′ del amplicón se obtuvo del clonaje intermedio en P-GEMTeasy, extrayéndose como HindIII/SpeI. En el plásmido se utilizaron los sitios HindIII y XbaI, compatible con SpeI.

Para el clonaje del gen completo, dado el tamaño del mismo (3954 pb), se obtuvieron dos fragmentos solapantes por PCR. Los oligonucleótidos utilizados se describen en la **tabla 3**. Los dos fragmentos se unieron utilizando el sitio BsrGI presente en la posición 1876 del gen. El gen total se clonó en el vector pDV-cGFP-cTAP utilizando los sitios de restricción HindIII y XbaI, presentes en el vector.

4.2.1.2 *dkc1*

El gen *dkc1* fue expresado utilizando el vector pDV-cGFP-cTAP y pDV:*dkc618*-cGFP-cTAP, al cual se le sustituyó el promotor de actina15 por 618 pb *upstream* al sitio +1 del gen *dkc1*. Los oligonucleótidos utilizados y descritos en la **tabla 3** permitieron que el amplicón *dkc1* estuviese flanqueado por los sitios de restricción HindIII y XbaI; y *dkc618* por Sall y BglII. *dkc1* fue incorporado en ambos vectores utilizando los sitios HindIII y XbaI presentes en el sitio de clonaje múltiple. *dkc618* fue incorporado entre los sitios Sall y BamHI (compatible con BglII) del plásmido pDV-cGFP-cTAP, liberándose un fragmento de 325 pb correspondiente al promotor de actina. *dkc1*

también fue clonado en el vector pDM324 utilizando los oligonucleótidos de la **tabla 3** y quedando el amplicón flanqueado por los sitios BglIII y SpeI.

4.2.1.3 *dkc1* mutada

Las mutaciones Ile23Thr, Thr33Met, Ser105Gly y Ala337Val en el gen *dkc1* se llevaron a cabo por PCR utilizando como molde el gen *dkc1* clonado en P-GEMTeasy con la enzima “Herculase II fusion”. El programa de PCR constaba de una desnaturalización inicial de 2 min a 95°C, 16 ciclos con una desnaturalización de 25 s a 95°C, una hibridación de los cebadores de 25 s a 55°C y un periodo de extensión de 3 min a 68°C y, finalmente un periodo de extensión adicional de 30 min a 68°C. Los oligonucleótidos portadores de las mutaciones a incorporar se describen en la **tabla 4**. La reacción resultante de PCR se purifica con QIAquick® Gel Extraction Kit y se digiere con DpnI (New England Biolabs. Massachusetts, EE.UU.). La inactivación de la enzima se produce a 80°C durante 20 min. El producto de PCR, tras la confirmación de la mutación por secuenciación, se clonó usando los sitios de restricción HindIII y XbaI en el vector pDV:*dkc618*-cGFP-cTAP.

4.2.1.4 *mre11*

El gen *mre11* se expresó utilizando los vectores pDV-cGFP-cTAP y pDBsrXP-6xMyc. Los oligonucleótidos utilizados y descritos en la **tabla 3** permitieron que el amplicón en el primer caso estuviese flanqueado por los sitios de restricción HindIII y XbaI; y PstI y BamHI, en el segundo. Estos mismos sitios de restricción fueron los utilizados en el sitio de clonaje múltiple de cada uno de los vectores para elaborar la construcción.

4.2.1.5 *rad51*

El gen *rad51* se expresó utilizando el vector pDV-cGFP-cTAP. Los oligonucleótidos utilizados y descritos en la **tabla 3** permitieron que el amplicón estuviese flanqueado por los sitios de restricción HindIII y XbaI. Estos mismos sitios de restricción fueron los utilizados en el sitio de clonaje múltiple para la construcción.

4.2.1.6 *rad50*

rad50 es un gen muy extenso (4170 pb), por lo que su clonaje se realizó obteniendo dos fragmentos solapantes por PCR. Los oligonucleótidos utilizados se describen en la

tabla 3. Los dos fragmentos se unieron utilizando el sitio NdeI presente en la posición 2071 del gen. El gen total se clonó en el vector pDV-cGFP-cTAP utilizando los sitios de restricción HindIII y XbaI presentes en el vector.

4.2.1.7 *smc6*

El gen *smc6* tiene 3763 pb y al igual que ocurría con *rad50*, el clonaje se hizo por la unión de dos fragmentos generados por PCR. Los oligonucleótidos utilizados se describen en la **tabla 3**. Los dos fragmentos se unieron utilizando el sitio BsmI presente en la posición 2051 del gen. El gen total se clonó en el vector pDM324 utilizando los sitios de restricción BamHI (compatible con BglII en el plásmido) y SpeI.

4.2.1.8 *suvA*

El gen *suvA* tiene 4694 pb, y como ya ocurría con *smc6* y *rad50*, el clonaje se hizo en dos partes, utilizando las dos parejas de oligonucleótidos descritos en la **tabla 3**. Ambos se unieron utilizando el sitio de restricción PvuI presente en la posición 2535 del gen. El gen completo se clonó en el vector pDM324 utilizando los sitios BglII y NheI (compatible con SpeI en el plásmido).

<i>tert5'</i> en pDV-cGFP-cTAP	Sentido 5'-3'	GGAAGCTTATGAATATTCAAAACATTTATAAAGAACC
	Antisentido 5'-3'	CCAGCCAATTTGAACCAATCAAC
<i>tert</i> en pDV-cGFP-cTAP	-Fragmento 5'-	
	Sentido 5'-3'	GGAAGCTTATGAATATTCAAAACATTTATAAAGAACC
	Antisentido 5'-3'	CCAGCCAATTTGAACCAATCAAC
	-Fragmento 3'-	
	Sentido 5'-3'	GTGGTGGTTATTTGAAGAGATC
	Antisentido 5'-3'	GGACTAGTATCAATTGATAAATTATCATTTATAG
<i>dkc618</i> en pDV-cGFP-cTAP	Sentido 5'-3'	GGGTCGACGGAACCTCAACAACATCATC
	Antisentido 5'-3'	GGAGATCTTGTTGAAATTTCTTATTTTAAA
<i>dkc1</i> en pDVcGFPcTAP y en pDV: <i>dkc618</i> -cGFP-cTAP	Sentido 5'-3'	GGAAGCTTATGACAACTGGTATGTGTGAAA
	Antisentido 5'-3'	GGTCTAGAATTCTTTGATTTCTTTTTTTCTT

<i>dkc1</i> en pDM324	Sentido 5'-3'	GGAGATCTATGACAACTGGTATGTGTGAAA
	Antisentido 5'-3'	GGACTAGTATTCTTTGATTTCTTTTTTTCTT
<i>mre11</i> en pDV-cGFP-cTAP	Sentido 5'-3'	GGAAGCTTATGGAAGAAGAAGAAATAATTGAACC
	Antisentido 5'-3'	GGTCTAGATTTCTTTGATCTTGATCTTTTTGAAAC
<i>mre11</i> en pDBsrXP-6xMyc	Sentido 5'-3'	GGCTCGAGATGGAAGAAGAAGAAATAATTGAACC
	Antisentido 5'-3'	GGGGATCCTTTCTTTGATCTTGATCTTTTTGAAAC
<i>rad51</i> en pDV-cGFP-cTAP	Sentido 5'-3'	GGAAGCTTATGGCATCAAGACAAAGACAAG
	Antisentido 5'-3'	GGTCTAGAATCGGAGATACCATCACTG
<i>rad50</i> en pDV-cGFP-cTAP	-Fragmento 5'-	
	Sentido 5'-3'	GGAAGCTTATGACATCAATTGAAAAATTATTAGTTC
	Antisentido 5'-3'	GGCATATGATTTCGAGTTCAATTTGTTTC
	-Fragmento 3'-	
	Sentido 5'-3'	GAAACAAATTGAACTCGAATCATATG
	Antisentido 5'-3'	GGTCTAGAAAGTTCAGCAATTTCTTTCTTTC
<i>smc6</i> en pDM324	-Fragmento 5'-	
	Sentido 5'-3'	GGGGATCCATGTCCAAGAGGAAGTTAGGGC
	Antisentido 5'-3'	GTTACCCATTGGACCCATTGG
	-Fragmento 3'-	
	Sentido 5'-3'	GGACTAGTGGGTAATACCATCTGGAATGG
	Antisentido 5'-3'	GGACTAGTATCAGTTTCAACAGTTACATCACC
<i>suvA</i> en pDM324	-Fragmento 5'-	
	Sentido 5'-3'	GGAGATCTATGGATATAAAGGATATTTTTTTTATAGATG
	Antisentido 5'-3'	GTAAGTGCATCGATGCAATCCCC
	-Fragmento 3'-	
	Sentido 5'-3'	GGGGATTGCATCGATGCAGTTAC
	Antisentido 5'-3'	GGGCTAGCTTTTCTTTTTTTTGAGACTTCGGGTACCC

Tablas 3. Oligonucleótidos utilizados para el clonaje de los diferentes insertos en los vectores de expresión indicados.

MUTACIÓN <i>dkc1</i>	SECUENCIA CEBADOR	
203T>C	Sentido 5'-3'	CAAGTTACTAAACCAGAAAAAACCC
	Antisentido 5'-3'	CTGGTTTAGTAACTTGTCAACTTC
233C>T y 234T>G	Sentido 5'-3'	CAATTTTAGATATGAGTAAATGGCCATTATTA
	Antisentido 5'-3'	GCCATTTACTCATATCTAAAATTGGGGTTTTT
448T>G y 449C>G	Sentido 5'-3'	CTGGTCACTCTGGTACATTGGATCC
	Antisentido 5'-3'	GTACCACCGTGACCAGTTTGGTTAC
1145C>T	Sentido 5'-3'	GACCACCGTTTCAATGGCCACTTGTG
	Antisentido 5'-3'	CCATTGAAACGGTGGTCATTGAGCG

Tabla 4. Secuencia de los cebadores utilizados para la mutagénesis dirigida en *dkc1* clonado en P-GEMTeasy.

4.2.2 Vector para la generación de la cepa *knock-out* de *tert*.

La construcción fue realizada sobre el vector pLPBLP utilizando secuencias específicas del genoma de *D. discoideum* que flanquearan el casete de resistencia a blasticidina, al igual que en la generación de los vectores para obtener los *knock-in* de *dkc1*. En el extremo 5' del casete se incorporó el fragmento comprendido entre los nucleótidos -313 a +736 en relación al punto +1 de *tert*. En el extremo 3' se incorporó el fragmento compuesto por los últimos 699 pb del gen más 303 pb adyacentes. El brazo -313/736 fue amplificado utilizando los oligonucleótidos descritos en la **tabla 5** y clonado utilizando los sitios de restricción KpnI y HindIII generados en la misma PCR. El otro brazo se clonó como brazo 3' al casete de blasticidina entre los sitios PstI y BamHI del plásmido.

4.2.3 Vector para la generación de los *knock-in* de *dkc1*. Mut 1 y 2

La construcción se hizo sobre el vector pLPBLP utilizando secuencias específicas del genoma de *D. discoideum* que flanquearon el casete de resistencia a blasticidina. En el extremo 5' del casete se incorporó el fragmento -1411 a -358 en relación al punto +1 de *dkc1*. En el extremo 3' se incorporó el fragmento compuesto por los 358 pb *upstream* al punto +1 de *dkc1* más el gen *dkc1* con la sustitución 203T>C para el *knock-in-dkc1*#1 o con las sustituciones 233C>T y 234T>G para el *knock-in-dkc1*#2. El brazo 1 o -1411/-358 fue amplificado utilizando los oligonucleótidos descritos en la **tabla 5** y clonado utilizando los sitios de restricción ApaI y SalI generados en la misma PCR. Con respecto al otro brazo, *dkc1*#1 o *dkc1*#2 se obtuvo cortando con las enzimas HindIII y

XbaI las construcciones pDV:*dkc618:dkc1#1*-cGFP-cTAP y pDV:*dkc618:dkc1#2*-cGFP-cTAP respectivamente. Este fragmento se fusionó al fragmento que comprendía los 358 pb *upstream* al punto +1 de *dkc1* obtenido por PCR con los oligonucleótidos descritos en la **tabla 5** flanqueado por los sitios de restricción PstI y HindIII. El fragmento final PstI-XbaI se clonó como brazo 3' al casete entre los sitios PstI y SpeI (compatible con XbaI) del plásmido.

pLPBLP:KO <i>tert</i>	Brazo 1	
	Sentido 5'-3'	GGGGTACCTAAAAGTCATCGATTTCGTTGGAC
	Antisentido 5'-3'	GGAAGCTTGTTTCTATTGGAGGTTGATCTAG
	Brazo 2	
	Sentido 5'-3'	GGCTGCAGAGGTGATGGTGATGATAATG
	Antisentido 5'-3'	GGGGATCCGGTAGTGGTAGTGGTAGTGG
pLPBLP: <i>knock-in-dkc1#1</i> pLPBLP: <i>knock-in-dkc1#2</i>	Brazo 1	
	Sentido 5'-3'	GGGGGCCCCGGTGTTGTAGAGATGCAAGATGG
	Antisentido 5'-3'	GGGTCGACGGATTTCTTGATGAAATACTAGGAG
	Brazo 2	
	Sentido 5'-3'	GGCTGCAGCTCCTAGTATTTTCATCAAGAAATCC
	Antisentido 5'-3'	GGAAGCTTTGTTGAAATTTCTTATTTTAAATAA

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para la elaboración de las construcciones plasmídicas utilizadas para la obtención de cepas *knock-in* y *knock-out*.

5. Transfecciones

Las transfecciones se realizaron mediante electroporación, como se ha descrito previamente [132]. 5×10^6 células de un cultivo en crecimiento exponencial ($1-3 \times 10^6$ células/mL), se lavaron dos veces en tampón de electroporación H50 frío (20 mM HEPES, 50 mM KCl, 10 mM NaCl, 1 mM $MgSO_4$, 5 mM $NaHCO_3$, 1 mM NaH_2PO_4) y finalmente se resuspendieron en 100 μ L de este medio junto con 10 μ g de la construcción plasmídica de interés en una cubeta de electroporación de 0,1 cm (Bio-Rad. California, EE.UU). La electroporación fue llevada a cabo en un electroporador “Gene Pulser” (Bio-Rad) con las constantes de capacitancia y voltaje de 25 μ F y 0,85 KV.

6. Generación cepa *knock-out* de *tert*

El plásmido pLPBLP: KO *tert* se digirió con las enzimas de restricción KpnI y BamHI para linealizar el fragmento del plásmido descrito en el apartado 4.2.2. El fragmento lineal se transfectó en la cepa AX4. Los clones resistentes a blasticidina (5µg/mL) que crecían en medio HL5 se aislaron sobre un césped bacteriano de *Klebsiella aerogenes* en placas de SM-agar. Cada uno de los clones se lisó a 95°C, 10 min en MasterAmp Buccal Swab DNA Extraction Solution (Epicentre, Wisconsin, EEUU). Esta mezcla se utilizó como sustrato para hacer PCRs. Se utilizaron tres parejas de oligonucleótidos (**tabla 6**) para el análisis. En la primera pareja, uno está presente en la zona homóloga al brazo 1 del gen y otro en la supuesta zona delecionada. En la segunda, ambos están en la zona delecionada y en la tercera los oligonucleótidos pertenecen al gen *dkc1* que sirven como control positivo de PCR. Posteriormente no se eliminó el casete de blasticidina.

7. Generación cepas *knock-in* de *dkc1*

7.1 Transfección y análisis de los clones

La transfección y el análisis de los clones siguen las mismas pautas que los descritos para la generación del *knock-out* de *tert*, exceptuando que en este caso se utilizaron como enzimas de restricción ApaI y NotI para linealizar los plásmidos pLPBLP: *knock-in-dkc1#1* y pLPBLP: *knock-in-dkc1#2* descritos en el apartado 4.2.3. Se utilizó una pareja de oligonucleótidos, uno diseñado en el brazo 5' y el otro en el brazo 3' (**tabla 6**) que permitió discriminar que clones habían presentado inserción aleatoria en su genoma confiriéndoles resistencia a blasticidina y cuales, en principio, presentaban la inserción del casete de blasticidina en la zona de interés. La segunda pareja de oligonucleótidos estaba formada por uno diseñado en el casete de blasticidina y otro *upstream* del punto -1411, y por ello fuera del brazo 1. Se utilizó una tercera pareja de oligonucleótidos para amplificar el fragmento que contenía la mutación y éste se secuenció para comprobar que la mutación estaba presente.

7.2 Eliminación resistencia a blasticidina

Los clones *knock-in* confirmados fueron transfectados con el plásmido pDEX-NLS-cre, el cuál sobreexpresa la enzima recombinasa bajo el promotor de actina 15. Esta enzima escinde mediante un bucle circular el ADN comprendido entre las dos secuencias loxP, de esta forma se elimina el casete de blasticidina. Se comprobó su eliminación aislando

clones sobre césped bacteriano de *Klebsiella aerogenes* en placas de SM-agar, y poniendo dichos clones a crecer en medio HL5 con blasticidina (5 µg/mL).

KO <i>tert</i>	Pareja 1	
	Sentido 5'-3'	CAGGTGAACTTATCAAAATACACC
	Antisentido 5'-3'	CTCGTTGTTCTTCATTCCTC
	Pareja 2	
	Sentido 5'-3'	GTGGTGGTTATTTGAAGAGATC
	Antisentido 5'-3'	CCAGCCAATTTGAACCAATCAAC
	Control positivo de PCR	
	Sentido 5'-3'	GGCTGCAGCTCCTAGTATTTTCATCAAGAAATCC
	Antisentido 5'-3'	GGAAGCTTTGTTGAAATTTCTTATTTTAAATAA
Knock-in- <i>dkc1</i> #1 Knock-in- <i>dkc1</i> #2	Pareja 1	
	Sentido 5'-3'	GGAAGTTCAACAACATCATC
	Antisentido 5'-3'	TTATTTAAAATAAGAAATTTCAACA
	Pareja 2	
	Sentido 5'-3'	CATCACCATTGAAGAGGGT
	Antisentido 5'-3'	CCAACCAAGTTTTTTTAAACC
	Pareja 3	
	Sentido 5'-3'	GGAAGCTTATGACAAGTGGTATGTGTGAAA
	Antisentido 5'-3'	GGAATTGGTGTATAATGACCAG

Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados para el análisis de los posibles clones *knock-in* para *dkc1* y *knock-out* para *tert*.

8. Localización celular

La localización de la proteína Dkc1 así como la de sus formas mutadas y la de las diferentes proteínas a estudio como posibles partícipes de los APBs (Mre11, Rad50, Rad51, Smc6 y SuvA), se basa en la transfección de células AX4 con las diferentes construcciones descritas anteriormente. 1×10^6 células de cada una de las cepas resultantes, en crecimiento exponencial, se crecieron sobre cubres de cristal o.n. Se fijaron con formaldehído al 3.7 % en HL5 durante 20 min. Tras lavar con PBS 1X dos veces en agitación suave, se incubaron con DAPI 1:500 en PBS 1X durante 15 min en agitación suave y oscuridad. Se lavaron en PBS 1X dos veces en agitación suave y se

montaron en Prolong (Thermo Fisher. Oregón, EE.UU). Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal LeicaTCS SP5 (Leica. Wetzlar, Alemania) usando un objetivo PL APO 63X/1.4-0.6 y el software ImageJ para su análisis.

8.1 Visualización de los nucléolos

1×10^6 células AX4, en crecimiento exponencial, se crecieron sobre cubres de cristal o.n. Se eliminó el medio y se fijaron en metanol pre-enfriado a -20°C durante 10 min. Posteriormente se lavaron tres veces en agitación suave con PBS 1X durante 5 min. Las células se incubaron con una solución 500 nM de *SYTO*® *RNASelect*™ *Green Fluorescent Cell Stain* (Thermo Fisher), preparada como indica el fabricante, durante 20 min a temperatura ambiente. Tras dos lavados en PBS 1X en agitación suave durante 5 min, se incubaron con DAPI 1:500 en PBS 1X durante 15 min en agitación suave y oscuridad. Se lavaron en PBS 1X dos veces en agitación suave y se montaron en Prolong. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal LeicaTCS SP5 usando un objetivo PL APO 63X/1.4-0.6 y el software ImageJ.

9. Estudio de crecimiento de la población

9.1 Curvas de crecimiento

1×10^5 células provenientes de cultivos en crecimiento exponencial, se centrifugaron y se pusieron en matraces de 125 mL de capacidad con 10 mL de medio HL5 y la droga de selección que habitualmente tenían en sus matraces originales de crecimiento. Se hicieron conteos cada 24 h sobre cámara de Neubauer con un microscopio Nikon ECLIPSE TS100 (Nikon. Tokio, Japón) y objetivo 40X.

9.2. Crecimiento sobre *Klebsiella aerogenes*

50 células provenientes de cultivos en crecimiento exponencial se hicieron crecer sobre *K. aerogenes*. Tras 96 horas se hicieron fotos de los halos de lisis con una cámara Nikon Coolpix 4500 (Nikon) asociada a una lupa Leica MZ6 (Leica) con un aumento 2.5 X. El diámetro de los halos se calculó en el programa de tratamiento de imagen ImageJ.

10. Ensayos de agregación

Para el desarrollo sincrónico, 2×10^7 células cuyo crecimiento estaba en fase exponencial se lavaron en PDF (20 mM KCl, 9 mM K_2HPO_4 , 13 mM KH_2PO_4 , 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgSO_4) para garantizar la ausencia de nutrientes y se depositaron sobre filtros de

nitrocelulosa (Millipore. Massachusetts, EE.UU.) que a su vez estaban sobre soportes de celulosa absorbente (Millipore). Se incubaron a 22°C en cámaras húmedas durante el tiempo necesario [133]. Se hicieron fotos a las 15 h, 19 h, 22 h y 24 h con una cámara Nikon Coolpix 4500 con un zoom 3.1 sobre una lupa Leica MZ6 con un aumento 2.5.

11. Análisis de la expresión génica

11.1 Extracción de ARN

El ARN se extrajo a partir de 1×10^7 células en crecimiento exponencial usando 1 mL de TRI Reagent (Sigma-Aldrich Inc. Missouri, EE.UU.) y siguiendo las indicaciones y protocolo del fabricante.

11.2 qRT-PCR

El ADN complementario (ADNc) fue generado a partir de 2 µg de ARN usando hexanucleótidos a modo de cebadores (Promega) y la enzima retrotranscriptasa M-MLV (Promega). Las mezclas de PCR, con un volumen final de 20 µL, se realizaron añadiendo Power SYBR Green PCR Mix (Applied Biosystems. California, EE.UU.) y fueron llevadas a cabo con el termociclador Step One Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Las condiciones utilizadas para la PCR fueron 95°C, 10 min; (95°C, 15 s; 45°C, 30 s; 62° 1 min) × 30–40 ciclos, como se ha descrito previamente [134]. El método utilizado para determinar los niveles de expresión relativa de los genes a estudio fue el método del C_T comparativo [135] utilizando como control endógeno la expresión del gen *rnIA*. Los oligonucleótidos utilizados para analizar la expresión de los genes se describen en la **tabla 7**.

GEN	ID Gen	SECUENCIA CEBADOR	
<i>dkc1</i> endógena	DDB_G0281933	Sentido 5'-3'	GATGACTCTGATGATGAATCATCC
		Antisentido 5'-3'	CCCACAAATTTATAAAGTTTATTTTATT AATTAG
<i>dkc1</i> plasmídica	DDB_G0281933	Sentido 5'-3'	GATGACTCTGATGATGAATCATCC
		Antisentido 5'-3'	CGTCGCCGTCCAGCTCGAC
<i>gar1</i>	DDB_G0279013	Sentido 5'-3'	CAGTTGATGAAATTTTCGGACC
		Antisentido 5'-3'	GGTACTTTAGCAATTGGTTTTGG

<i>nbp2</i>	DDB_G0289699	Sentido 5'-3'	GGCGATGTCAGCCCAATCG
		Antisentido 5'-3'	GTTGATGAAGCAGTACCTAAAG
<i>nop10</i>	DDB_G0288347	Sentido 5'-3'	GTACTATAACGACAAAGATGGCC
		Antisentido 5'-3'	CCAAATCTCTTCTTTAATGCAATTC
<i>rn1A</i>	DDB_G0294034	Sentido 5'-3'	GGGTAGTTTGA CTGGGGCGG
		Antisentido 5'-3'	CAC TT TAATGGGTGAACACC

Tabla 7. Oligonucleótidos empleados para el análisis de la expresión génica por RT-PCR cuantitativa. También se indica el número identificador de cada gen analizado (www.dictybase.org)

12. Ensayo de pseudouridilación

12.1 Tratamiento con CMCT

Para el ensayo de pseudouridilación se siguió el principio metodológico descrito previamente [136] y modificado para este fin. 8 µg secos de ARN (AX4, AX4/dkc618::*dkc1*, AX4/dkc618::*dkc1*#1, AX4/dkc618::*dkc1*#2, AX4/dkc618::*dkc1*#3, AX4/dkc618::*dkc1*#4, *Knock-in-dkc1*#1 y *Knock-in-dkc1*#2) extraído como se indica en el apartado 11.1 se resuspendieron en 30 µL de buffer BEU pH 9 (urea 7M, EDTA 4mM, Bicine 50 mM, pH 8,5) o en buffer BEU con CMCT (1-ciclohexil-3-(2-morfolinoetil) carbodiimida meto-p-toluenosulfonato) (Sigma) 0,17 M y se incubaron a 37°C 20 min. Para precipitar, se añadieron 100 µL de Buffer A (acetato sódico 0,3M pH 5,6; 0,1 mM EDTA) y 700 µL etanol absoluto, después de 5 min en hielo seco se centrifugaron a 4°C, 10 min, 14000 rpm. El precipitado se lavó con etanol al 70%, se resuspendió de nuevo en 100 µL de Buffer A y 300 µL de etanol y se volvió a lavar en etanol al 70%. Las centrifugaciones intermedias fueron a 4°C durante 10 min a 14000 rpm. El precipitado se resuspendió en buffer carbonato sódico pH 10,4 (carbonato sódico 50 mM, EDTA 2 mM) durante 3 h a 37°C. Para precipitar el ARN se añadieron 100 µL de Buffer A y 700 µL etanol absoluto, después de 5 min en hielo seco, se centrifugaron 10 min a 4°C y 14000 rpm. Tras la centrifugación el precipitado se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en 40 µL agua libre de ARNasa.

12.2 qRT-PCR

Se siguió el mismo procedimiento que en el punto 11.2, pero utilizando 500 ng para la retrotranscripción. Para normalizar los niveles de pseudouridilación de los ARNs se utilizaron los datos de las muestras sin tratar con CMCT. Los oligonucleótidos para este análisis se describen en la **tabla 8**.

<i>sno18</i>	DDB_G0295543	Sentido 5'-3'	CAGCCTGCCTCCGTTTTGTGTTTG
		Antisentido 5'-3'	GATTACAGATTGATTAAAGGCACATGTATG
<i>ARNr 26s</i>	DDB_G0295653	Sentido 5'-3'	CCGCTGAACTTAAGCATATCAGTAAGC
		Antisentido 5'-3'	GCAGTCACAACAGCGGGCTCC

Tabla 8. Oligonucleótidos utilizados para el análisis de los niveles de pseudouridilación por qRT-PCR. También se indica el número identificador de cada gen analizado (www.dictybase.org)

13. Niveles de maduración de ARN ribosomal (ARNr)

1 µg de ARN extraído como se indica en el punto 11.1 de las diferentes cepas (AX4, AX4/*dkc618::dkc1*, AX4/*dkc618::dkc1#1*, AX4/*dkc618::dkc1#2*, AX4/*dkc618::dkc1#3*, AX4/*dkc618::dkc1#4*, *Knock-in-dkc1#1* y *Knock-in-dkc1#2*), se utilizó para realizar la retrotranscripción y posterior PCR cuantitativa como se detalla en el punto 11.2. Los niveles de expresión a estudio fueron los correspondientes al gen *ARNr 26s* y los correspondientes al pre-ARNr. Para el *ARNr 26s* se utilizaron los oligonucleótidos descritos en la **tabla 8**, para el pre-ARNr los oligonucleótidos fueron GGGAACGGTGTACGCGCTGG y GCAGTCACAACAGCGGGCTCC sentido 5'-3' y antisentido 5'-3' respectivamente. En el caso del pre-ARNr, un oligonucleótido está situado en el ITS2 (del inglés, *internal transcribed spacer*) que separa el *ARNr 5s* del *ARNr 26s* y el otro está situado en el propio *ARNr 26s*. Como control endógeno se utilizó la expresión del gen *rnlA* (**tabla 7**).

14. Análisis del daño al ADN

14.1 Análisis por *Western-blot*

14.1.1 Tratamiento con bleomicina

5×10^6 de células de las cepas AX4, AX4/dkc618::*dkc1*, AX4/dkc618::*dkc1*#1, AX4/dkc618::*dkc1*#2, AX4/dkc618::*dkc1*#3, AX4/dkc618::*dkc1*#4, *Knock-in-dkc1*#1 y *Knock-in-dkc1*#2 en crecimiento exponencial se sembraron sobre placas P100 añadiendo 10 mL de medio HL5 más la droga de selección, excepto en las AX4. Las células se dejaron entre 12 y 15 h y se incubaron con 5 $\mu\text{g/mL}$ de bleomicina durante 3 horas.

14.1.2 Aislamiento de proteínas nucleares

Las células se levantaron con repipeteo, se lavaron en buffer KK2 (KH_2PO_4 0,16 M, K_2HPO_4 0,04 M) y se lisaron en 200 μL de NIB1 *ice-cold* (50 mM Tris-Hcl pH 7,8; 5 mM Acetato Mg; 10% sacarosa; 2% NP40) al cuál se añadieron los siguientes inhibidores de proteasas (0,5 mM AEBSF, 2 $\mu\text{g/mL}$ leupeptina, 2 $\mu\text{g/mL}$ aprotinina, 1 mM Na_3VO_4 , 0,5 mM DTT). La mezcla se mantuvo 3-5 min en hielo, se centrifugó 5 min a 2300 g y el sedimento resultante se resuspendió en 100 μL de *buffer* Laemmli (2% SDS, 5% 2-mercaptoetanol, 10% glicerol, 0,002% azul de bromofenol, 0,06 M Tris-HCl).

14.1.3 SDS-PAGE

20 μL de cada muestra del punto 14.1.2 calentadas a 95°C 5 min y enfriadas se depositaron en pocillos de un gel de poliacrilamida elaborado al 15%. La electroforesis se dejó correr 60 min a 150 V. Para el análisis por *western-blot*, las proteínas se transfirieron a 4°C durante 60 min a 180 V a una membrana Immobilon-P (Merck Millipore. Massachusetts, EE.UU). Para determinar el daño al ADN, se cuantificaron los niveles de la histona γH2AX fosforilada con el anticuerpo Phospho-Histone H2A.X (Ser139) (Cell signaling. Massachusetts, EE.UU.) 1:1000. Como control de carga se utilizó un anticuerpo anti-actina (Sigma) 1:200. En ambos casos el anticuerpo secundario fue anti-conejo IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology. Texas, EE.UU) 1:2000. La solución de revelado utilizada fue Western Blotting Luminol Reagent (Santa Cruz Biotechnology). El análisis de expresión se realizó con el software ImageJ.

14.2 Inmunofluorescencia

1×10^6 de células de las cepas AX4/dkc618::*dkc1*, AX4/dkc618::*dkc1*#1, AX4/dkc618::*dkc1*#2, AX4/dkc618::*dkc1*#3, AX4/dkc618::*dkc1*#4 en crecimiento exponencial se crecieron sobre cubres de cristal o.n añadiendo 5 $\mu\text{g/mL}$ de bleomicina. Las células se se fijaron con paraformaldehído al 3,7 %. El anticuerpo utilizado fue el mismo que el utilizado para *western-blot*, Phospho-Histone H2A.X (Ser139) 1:100. El anticuerpo secundario fluorescente fue Alexa Fluor 546 anti-conejo (Life technologies. California, EE.UU) 1:500. El montaje fue en Prolong y la visualización de los núcleos se hizo tiñendo con DAPI (1:500) las células, previamente al montaje. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal LeicaTCS SP5 usando un objetivo PL APO 63X/1.4-0.6

RESULTADOS

1. Telómeros

Los telómeros de *Dictyostelium discoideum* se sabe que no presentan ningún tipo de similitud con las secuencias altamente repetitivas y estructuradas que tienen los organismos que utilizan telomerasa, sugiriendo que los cromosomas terminan en motivos semejantes al ADNr [31, 137]. Son secuencias heterogéneas que se podrían mantener por fenómenos de recombinación homóloga.

Un estudio publicado en 1981 [31] y apoyado en el mapa de restricción publicado previamente [138] estableció que el extremo del cromosoma ribosomal era heterogéneo en tamaño. El estudio de su secuencia mostraba que existían cuatro repeticiones de 29 pb y una secuencia satélite final de entre unos 100-200 pb con la fórmula C_nT , variando -n- entre 1 y 8. La heterogeneidad se debía a esta última secuencia satélite. Pese a su antigüedad, estudios mucho más recientes [2] no han conseguido revelar mucha más información al respecto.

Dado que en el artículo se mostraba por un lado la secuencia de las cuatro repeticiones y por otro, la secuencia satélite sin especificar si estas eran consecutivas, diseñamos cuatro oligonucleótidos utilizando la secuencia publicada. Dos estaban diseñados con la secuencia publicada y la reversa, en la región previa a las 4 repeticiones comentadas y los otros dos se diseñaron, de la misma forma pero en la secuencia satélite. Se hicieron reacciones de PCR con todas las mezclas de oligonucleótidos. La reacción de PCR que amplificó, fue la que contenía el oligonucleótido F1 (ver Materiales y Métodos) idéntico a la secuencia publicada previa a las repeticiones y el oligonucleótido R2 reverso a la secuencia satélite publicada (**figura 14**). Al secuenciar el producto de PCR se observó que la secuencia satélite C_nT , realmente era G_nA , como se muestra en la **figura 14**. Por otro lado se consiguió amplificar en esta reacción de PCR 150 pb nuevos y adicionales situados 5' a la secuencia publicada en el trabajo mencionado. Esto fue debido a que el oligonucleótido F1 diseñado en la región previa a las cuatro repeticiones hibridó en dos regiones anteriores idénticas (**Figura 14**). Además, la secuenciación del producto de PCR, pudo elucidar la secuencia satélite que se muestra en la **figura 14**.

CLON 1	1	-----GGTT	4
CLON 2	1	-----GGTT	4
CLON 3	1	<u>GGTTAGCGGTGGGAATCGAACC</u> GGTGATCCGAAGAAGTCGGCCACACTCAAGAAGCTAGCTACTCCCCTCGAAAATGGTT	80
CLON 4	1	-----GGTT	4
CLON 5	1	<u>GGTTAGCGGTGGGAATCGAACC</u> GGTGATCCGAAGAAGTCGGCCACACTCAAGAAGCTAGCTACTCCCCTCGAAAATGGTT	80
CLON 6	1	-----	0
CLON 7	1	-----GGTT	4
CLON 8	1	-----GGTT	4
CLON 9	1	-----GGTT	4
CLON 1	5	<u>AGCGGTGGGAATCGAACC</u> GGTGATCCTGAAGAAGTCGGCCACACTCAAGAAGCTAGCTACTCCCCTCGAAAAG---TGG	80
CLON 2	5	<u>AGCGGTGGGAATCGAACC</u> GGTGATCC-GAAGAAGTCGGCCACACTCAAGAAGCTAGCTACTCCCCTCGAAAAG---TGG	79
CLON 3	81	<u>AGCGGTGGGAATCGAACC</u> GGTGATCC-GAAGAAGTCGGCCACACTCAAGAAGCTAGCTACTCCCCTCGAAGGA---TGG	155
CLON 4	5	<u>AGCGG-GGGAATCGAACC</u> TGCAATCA-GCCGAAGG-GGGGGCACTTAAAAAGCTAGCTACTCCCCTCGAAAAT---TGG	77
CLON 5	81	<u>AGCGGTGGGAATCGAACC</u> GGTGATCC-GAAGAAGTCGGCCACACTCAAGAAGCTAGCTACTCCCCTCGAAGGA---TGG	155
CLON 6	1	-----GG	2
CLON 7	5	<u>AGCGGTGGGAATCGAACC</u> GGTGATCC-GAAGAAGTCGGCCACACTCAAGAAGCTAGCTACTCCCCTCGAAGAGGGGAGGG	83
CLON 8	5	<u>AGCGGTGGGAATCGAACC</u> GGTGATCC-GAAGAAGTCGGCCACACTCAAGAAGCTAGCTACTCCCCTCGAAGAGGGGATGG	83
CLON 9	5	<u>AGCGGTGGGAATCGAAC</u> -GGTGACC--GAAGAAGTCGGCCACACTCAAGAAGCTAGCTACTCCCCTCGAAGAGGGGATGG	81
**			
CLON 1	81	TTAGCGGTGGGAATCGAACCGGTGATCGATGAATTTTGGCTCCATGGTGGCTAAATTTTGGCTTCATGGTAG	160
CLON 2	80	TTAGCGGTGGGAGTCGAACCGGTGATCGATGAATTTTGGCTCCATGGTGGCTAAATTTTGGCTTCATGGTGG	159
CLON 3	156	TTAGCGGTGGGAATCGAACCGGTGATCGATGAATTTTGGCTCCATGGTGGCTAAATTTTGGCTTCATGGTGG	235
CLON 4	78	TTAGCGGTGGGAATCGAACCGGTGATCGATGAATTTTGGCTCCATGGTGGCTAAATTTTGGCTTCATGGTGG	157
CLON 5	156	TTAGCGGTGGGAATCGAACCGGTGATCGATGAATTTTGGCTCCATGGTGGCTAAATTTTGGCTTCATGGTGG	235
CLON 6	3	TTAGCGGTGGGAATCGAACCGGTGATCGATGAATTTTGGCTCCATGGTGGCTAAATTTTGGCTTCATGGTGG	82
CLON 7	84	TTAGCGGTGGGAATCGAACCGGTGATCGATGAATTTTGGCTCCATGGTGGCTAAATTTTGGCTTCATGGTGG	163
CLON 8	84	TTAGCGGTGGGAATCGAACCGGTGATCGATGAATTTTGGCTCCATGGTGGCTAAATTTTGGCTTCATGGTGG	163
CLON 9	82	TTAGCGGTGGGAATCGAACCGGTGATCGATGAATTTTGGCTCCATGGTGGCTAAATTTTGGCTTCATGGTGG	161

CLON 1	161	CTAGGATGAATTTTGGCTTCATGGTGGCTAGGATGAATTTTGGCTCCATGGTGGCTAAATTTTATCATGGT	240
CLON 2	160	CTAGGATGAATTTTGGCTTCATGGTGGCTAGGATGAATTTTGGCTCCATGGTGGCTAAATTTTATCATGGT	239
CLON 3	236	CTAGGATGAATTTTGGCTTCATGGTGGCTAGGATGAATTTTGGCTCCATGGTGGCTAAATTTTATCATGGT	315
CLON 4	158	CTAGGATGAATTTTGGCTTCATGGTGGCTAGGATGAATTTTGGCTCCATGGTGGCTAAATTTTATCATGGT	237
CLON 5	236	CTAGGATGAATTTTGGCTTCATGGTGGCTAGGATGAATTTTGGCTCCATGGTGGCTAAATTTTATCATGGT	315
CLON 6	83	CTAGGATGAATTTTGGCTTCATGGTGGCTAGGATGAATTTTGGCTCCATGGTGGCTAAATTTTATCATGGT	162
CLON 7	164	CTAGGATGAATTTTGGCTTCATGGTGGCTAGGATGAATTTTGGCTCCATGGTGGCTAAATTTTATCATGGT	243
CLON 8	164	CTAGGATGAATTTTGGCTTCATGGTGGCTAGGATGAATTTTGGCTCCATGGTGGCTAAATTTTATCATGGT	243
CLON 9	162	CTAGGATGAATTTTGGCTTCATGGTGGCTAGGATGAATTTTGGCTCCATGGTGGCTAAATTTTATCATGGT	241

CLON 1	241	TCAATTCGGCCACCTAGGTATATGAGGGGGGAGACAGGGGGG-AGAGGGGGGGAGGAGGG-GGGGAGAGGGGGAGGA	318
CLON 2	240	CCAATTCGGCCACCTAGGTATATGAGGGGGGAGACAGGGGGGAGAGGGGGGGAGGGGGAGGGGGAGGGGGAGGA	319
CLON 3	316	TCAATTCGGCCACCTAGGTATATGAGGG----GACAGGGGAG-AGAGGGAGGGG-GGAGGG--GGAG-----	375
CLON 4	238	TCAATTCGGCCACCTAGGTATATGAGGGGGGAGACAGGGGGGAGAGGGAGGGG-GGAGGG--GGGAGAGGGGGAGGA	314
CLON 5	316	TCAATTCGGCCACCTAGGTATATGAGGG----GACAGGGGAG-AGAGGGAGGGG-GGAGGG--GGGAG-----	375
CLON 6	163	TCAATTCGGCCACCTAGGTATATGAGGGGGGAGACAGGGGGGAGAGGGAGGGG-GGAGGG--GGGAG-----	228
CLON 7	244	TCAATTCGGCCACCTAGGTATATGAGGGGGGAGACAGGGGGGAGAGGGAGGGG-GGAGGG--GGGAG-----	309
CLON 8	244	TCAATTCGGCCACCTAGGTATATGAGGGGGGAGACAGGGGGGAGAGGGAGGGG-GGAGG-----	303
CLON 9	242	TCAATTCGGCCACCTAGGTATATGAGGGGGGAGACAGGGGGGAGAGGGAGGGG-----	296

CLON 1	319	GGGGGAGGGGGGAGGGGGGAGAGGAGGGAGGG---GGGAGGGGGAG-----	362
CLON 2	320	GGGGGAGGGGGGAGGGGGGAGAGGAGGGGGAGGGGGGAGGGGGAGGGGGAG-----	373
CLON 3	376	-----	375
CLON 4	315	GGGGGAGGGGGGAGGGGGGAG-----	335
CLON 5	376	-----	375
CLON 6	229	-----	228
CLON 7	310	-----	309
CLON 8	304	-----	303
CLON 9	297	-----	296

Figura 14. Secuencia obtenida del producto de PCR amplificado con los oligonucleótidos F1 y R2 diseñados con la secuencia del trabajo de Emery & Weiner [31]. En rojo se muestran los 150 pb nuevos encontrados. Subrayado con línea continua se indica la disposición del oligonucleótido F1. En negro se muestra la secuencia que contiene las cuatro repeticiones y en azul el inicio de la secuencia satélite (G_nA). Remarcado en amarillo se muestra una secuencia corta homóloga (GATGA), que precede a la primera repetición e indica el fin de cada una y el inicio de la siguiente.

Con todo esto, podemos establecer en el extremo del cromosoma ribosomal de *D. discoideum* la existencia de una hebra-G y una hebra-C como ocurre en los organismos eucariotas. En eucariotas el extremo 3' de la hebra-G se extiende para formar una hebra

única llamada cola-G [27]. Para comprobar la existencia de un extremo 3' monocatenario, incubamos ADN de *D. discoideum* con las enzimas nucleasa S1 y Exonucleasa I (Exo I). La primera degrada ácidos nucleicos de cadena sencilla y la segunda degrada ácidos nucleicos de cadena sencilla en dirección 3'-5'. En la **figura 15**, se muestra el resultado de la PCR realizada con los oligonucleótidos utilizados anteriormente y con las muestras incubadas con las enzimas S1 y Exo I que demuestra la existencia de un extremo monocatenario digerible con estas enzimas.

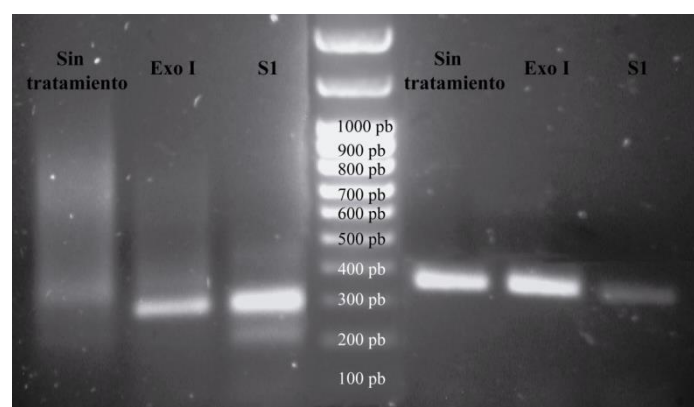


Figura 15. El cromosoma ribosomal de *D. discoideum* presenta un extremo monocatenario en 3'. Los tres primeros carriles muestran la PCR realizada con los oligonucleótidos F1 y R2 y el ADN de *D. discoideum* sin tratar o tratado con las enzimas Exo I o S1. En el primer carril no existe una banda nítida y concreta como ocurre cuando se tratan las muestras con las enzimas. Se da una amplificación heterodispersa hasta aproximadamente los 1000 pb de longitud. Los tres últimos carriles muestran una PCR control con una pareja de oligonucleótidos que amplifican un fragmento de *dkc1*.

2. Tert

Dictyostelium discoideum presenta un gen homólogo al que codifica para TERT humana, cuyo número de identificación es DDB_G0293918.

Con el fin de elucidar el papel que juega *tert* en *D. discoideum* realizamos en primer lugar, un alineamiento de las secuencias proteicas de TERT humana y de *D. discoideum* con el algoritmo ClustalW (**Figura 16**). Los porcentajes de alineamiento e identidad son de un 52% y un 23% respectivamente, con un nivel de significación o probabilidad de que se deba al azar de $2e^{-18}$. El mayor porcentaje de aminoácidos conservados se encuentra en lo dominios de unión al ARN y retrotranscriptasa (**Figura 16**). Con respecto a este último, el dominio está interrumpido por una extensa secuencia de asparaginas (N) lo que podría inhabilitar la función retrotranscriptasa. Se realizó la

asparaginas podría interferir con la sobreexpresión de la proteína, por lo que el plásmido expresa los primeros 1943 nucleótidos del gen, previos a dicha secuencia. Se observó señal fluorescente en el citoplasma, no así en el núcleo (**figura 17B**). Estos datos indican que TERT podría no tener localización nuclear en *D. discoideum*.

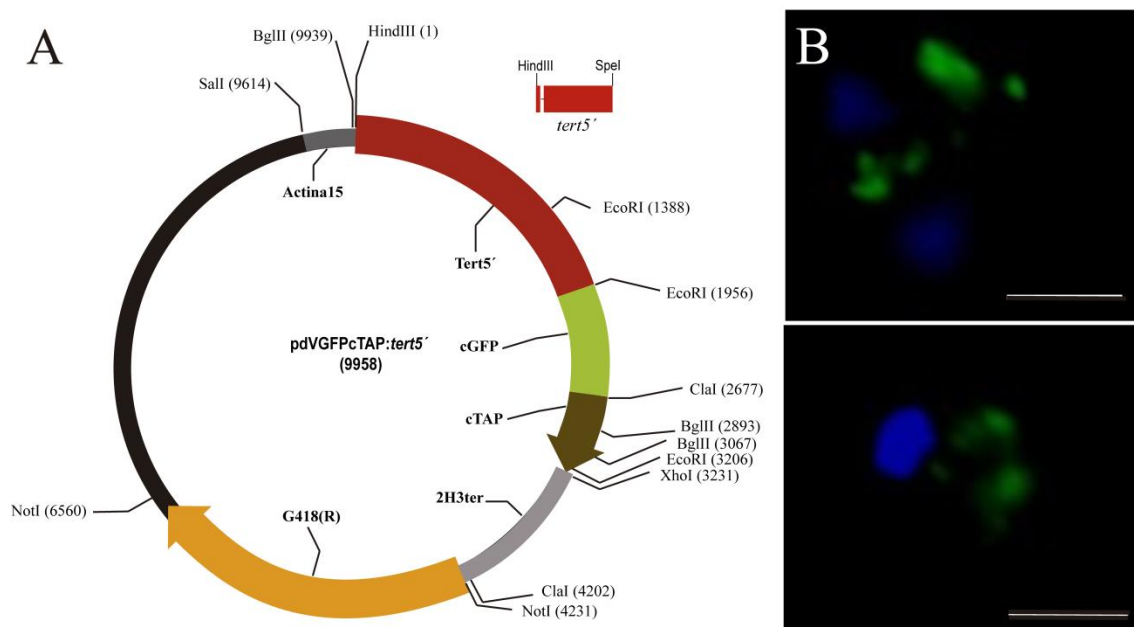


Figura 17. La expresión del fragmento 5' de *tert* es citoplásmica. **A.** Construcción diseñada con los primeros 1943 pb del gen *tert* de *D. discoideum*. Se muestran los elementos y los sitios de restricción más importantes, siendo los sitios HindIII y XbaI los utilizados para la construcción. El fragmento insertado estaba flanqueado por los sitios HindIII y SpeI, compatible con XbaI. En la esquina superior se muestra la región del gen expresada: un primer exón de 447 pb, un intrón de 141 pb y los primeros 1355 pb del segundo y último exón. **B.** La construcción transfectada en células AX4, revela que la localización del fragmento previo al elemento rico en asparaginas no es nuclear. Barra de escala = 5 μm.

La forma más ortodoxa para comprobar si un gen participa en una vía o proceso metabólico, o si se requiere para la supervivencia de la célula es silenciarlo o directamente eliminarlo mediante la generación de una cepa *knock-out*. Para este fin *D. discoideum* es un muy buen sistema ya que es haploide por lo que tan sólo se debe de eliminar una copia del gen para valorar las consecuencias. Realizamos la generación de dicho mutante transfectando células AX4 con el fragmento linealizado del plásmido pLPBLP:KO *tert* (**Figura 18A**), que incorpora el casete de blasticidina y provoca una delección de 2519 pb por recombinación homóloga (**Figura 18B**). La validación de los clones obtenidos se realizó por PCR utilizando dos parejas de oligonucleótidos (**tabla 6**)

para confirmar la delección, así como se utilizó una tercera pareja (**tabla 6**) como control positivo de la PCR para ratificar que no estábamos ante una ausencia de bandas por no haber material genómico en la muestra (**figura 18B**). Se caracterizó una cepa *knock-out* para *tert* que se mantuvo varios meses en cultivo, realizándose periódicamente experimentos de medición de duplicación poblacional (**Figura 18C**) en los que no manifestó ninguna anomalía con respecto a las cepas control.

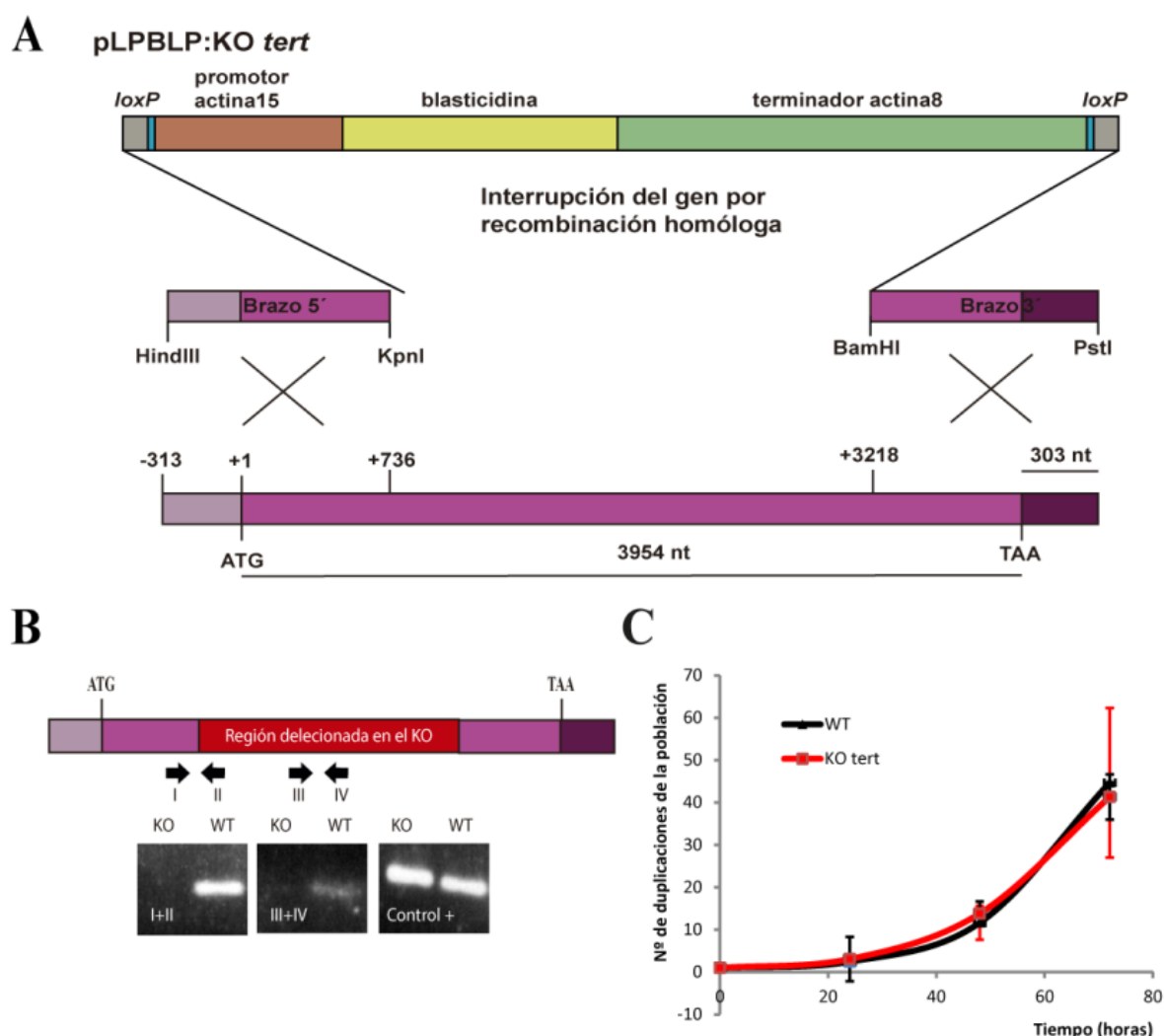


Figura 18. Generación de cepas *knock-out* para el gen *tert*. **A.** Creación de mutantes *knock-out* para el gen *tert* por recombinación homóloga. Se muestra el fragmento linealizado de la construcción pLPBLP:KO *tert* y los brazos del gen *tert* a través de los cuales puede ocurrir la recombinación homóloga. **B.** Validación del *knock-out* de *tert* por PCR. Los oligonucleótidos se indican con números romanos y flechas. El control positivo de PCR se realizó amplificando un pequeño fragmento de *dkc1*. **C.** Gráfica compendio de varios ensayos que muestra la proliferación de las células *wild type* AX4 (WT) y mutantes para *tert* (KO *tert*).

3. APBs (*ALT-associated PML bodies*)

Algunas células presentan una vía alternativa de elongación de telómeros, independiente de telomerasa, denominada ALT (del inglés, *Alternative Lengthening of telomeres*), que utiliza mecanismos de recombinación homóloga [139]. Las células que utilizan este proceso, presentan numerosas características entre ellas la presencia de cromatina telomérica agrupada en cuerpos promielocíticos (PML) referidos o asociados a la vía ALT denominados APBs (del inglés *ALT-associated PML bodies*) y la presencia de altos niveles de ADN telomérico extracromosomal en forma de ADN lineal o circular de doble cadena o de cadena sencilla conocido como círculos-t [52].

Como se concluía en el apartado anterior que no existe un papel esencial para el gen *tert*, nos planteamos buscar si *D. discoideum* presenta alguna de las características que definen a las células ALT y que permitan elucidar si es éste su mecanismo de mantenimiento de los telómeros. Con el objetivo de profundizar sobre la existencia de los APBs, su localización y las proteínas que los forman, se estudió la localización subcelular de proteínas que acorde con la bibliografía estuvieran presentes en los APBs de células de mamífero [62]. Asimismo se estudió la localización de proteínas que tuvieran capital importancia en los procesos de rotura y reparación del ADN y fuesen partícipes del fenómeno de recombinación homóloga propio de la vía ALT. El primer requisito en estos estudios fue, por supuesto, la existencia de estas proteínas en *D. discoideum*, con una alta tasa de homología con las proteínas de mamífero.

3.1 Mre11/Rad50

El complejo compuesto por estas proteínas en mamíferos se denomina MRN (MRE11, RAD50, NBS1). *D. discoideum* presenta las dos primeras, no existiendo ningún ortólogo de NBS1.

Al realizar un alineamiento de secuencia se obtiene que la proteína Mre11 presenta un alineamiento del 68%, un porcentaje del 44% de identidad y un valor de significación de $1e^{-145}$. Cuando realizamos el mismo estudio con Rad50 los parámetros obtenidos son un alineamiento del 99% con un porcentaje de identidad del 30% y un valor de significación de $1e^{-165}$.

Se estudió la localización subcelular de estas dos proteínas mediante la transfección de células AX4 con construcciones que portaran cada uno de los genes, resultando en proteínas de fusión con GFP. Al transfectar las células con la construcción pDV-cGFP-cTAP:*mre11* (**figura 19A**), el patrón de expresión que se observó en la célula fue meramente nuclear. Dentro del núcleo la expresión no fue ubicua sino que la fluorescencia de GFP mostró *foci* delimitados en el mismo (**Figura 20A**), lo que da pie a pensar que pueden formar parte de cuerpos nucleares. Por el contrario cuando transfectamos las células AX4 con la construcción pDV-cGFP-cTAP:*rad50* (**figura 19B**), la expresión mayoritaria y de forma extensa se encontró en el citoplasma (**Figura 20B**). No obstante, se encontró en menor medida algún punto de expresión dentro del núcleo. Hay que indicar que un porcentaje significativo de células eran gigantes y multinucleadas.

También observamos que al hacer una cotransfección de ambas proteínas manteniendo la misma construcción para Rad50 pero expresando Mre11 unida al epítipo Myc, el cuál será detectado por inmunofluorescencia, con el vector pDBsrXP-6xMyc:*mre11* (**figura 19C**), la expresión de ambas proteínas cambió radicalmente. En el caso de Mre11, la expresión que antes revelaba *foci* nucleares, ahora era ubicua en el núcleo; por el contrario, en el caso de Rad50, la expresión que antes era mayoritariamente citoplásmica, ahora fue puramente nuclear y ubicua (**Figura 20C**). Este resultado pone de manifiesto la importancia del equilibrio en los niveles de expresión que tienen que tener ambas proteínas para que la localización sea correcta y por *ende* su función, lo cual será comentado en la discusión. Por otro lado, aunque no se han podido observar en la cotransfección *foci* similares a los observados cuando sólo se transfectaban las células con la construcción portadora de *mre11*, sí existe colocalización de ambas, lo que ayudaría a corroborar que ambas proteínas se asocian.

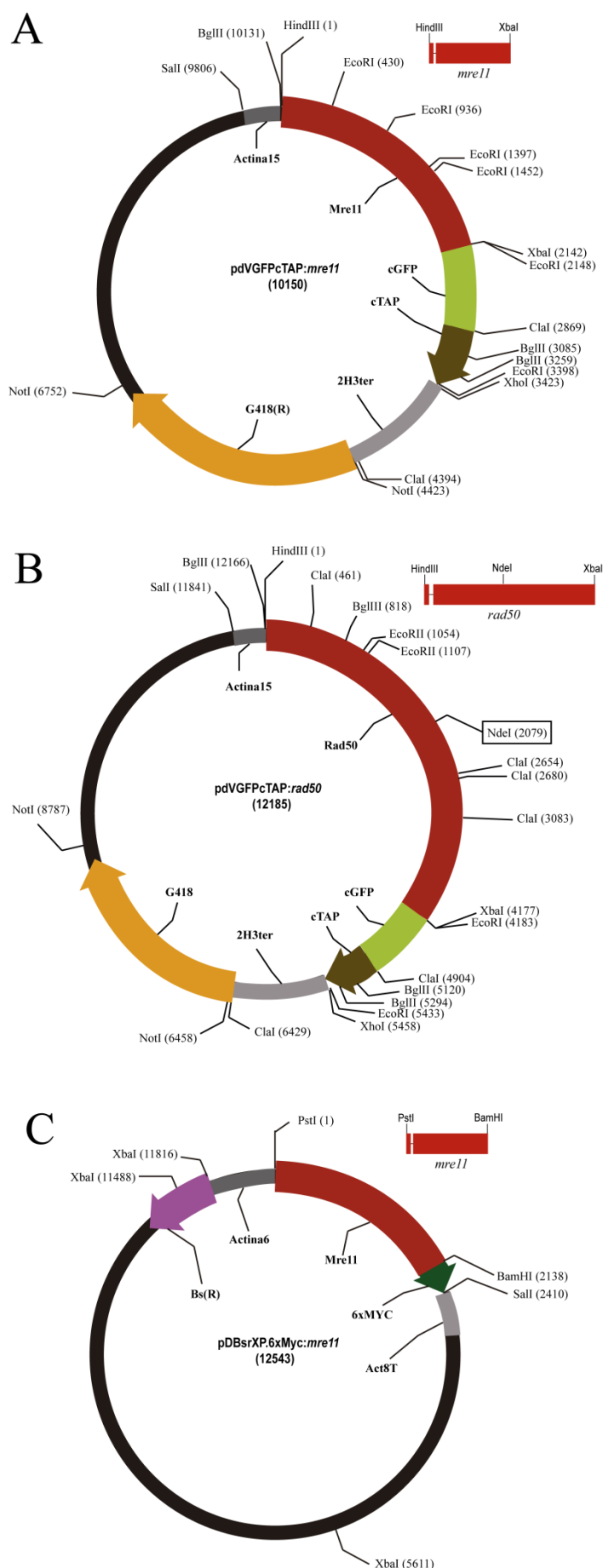


Figura 19. Construcciones empleadas para la visualización de la expresión de las proteínas Mre11 y Rad50 en células AX4. En los plásmidos pdV-cGFP-cTAP:*mre11* (A) y pdV-cGFP-cTAP:*rad50* (B) la expresión está sujeta a la actividad del promotor de actina 15. Se muestran en las construcción la disposición del gen, cGFP, cTAP, el terminador 2H3 y la resistencia a G418. Se indican los sitios de restricción de especial relevancia. En la figura B aparece recuadrado el sitio NdeI que fue utilizado para fusionar los dos fragmentos que se obtuvieron por PCR para lograr el gen entero. En la esquina superior derecha de cada construcción se muestra la estructura de cada uno de los genes expresados y los sitios de restricción que flanquean al amplicón obtenido por PCR con los oligonucleótidos descritos en la **tabla 3**. *mre11* presenta dos exones de 116 pb y 1953 pb separados por un intrón de 66 pb. *rad50* está formado por un exón de 123 pb y otro de 3932 pb separados por un intrón de 115 pb. C. Construcción pDBsrXP-6xMyc:*mre11* donde se muestran el propio gen, cuya expresión está regulada por el promotor de actina 6, el epitopo 6xMyc, el terminador de actina 8 y la resistencia a blasticidina. Se indican los sitios de restricción más importantes y en la esquina superior derecha la estructura del gen.

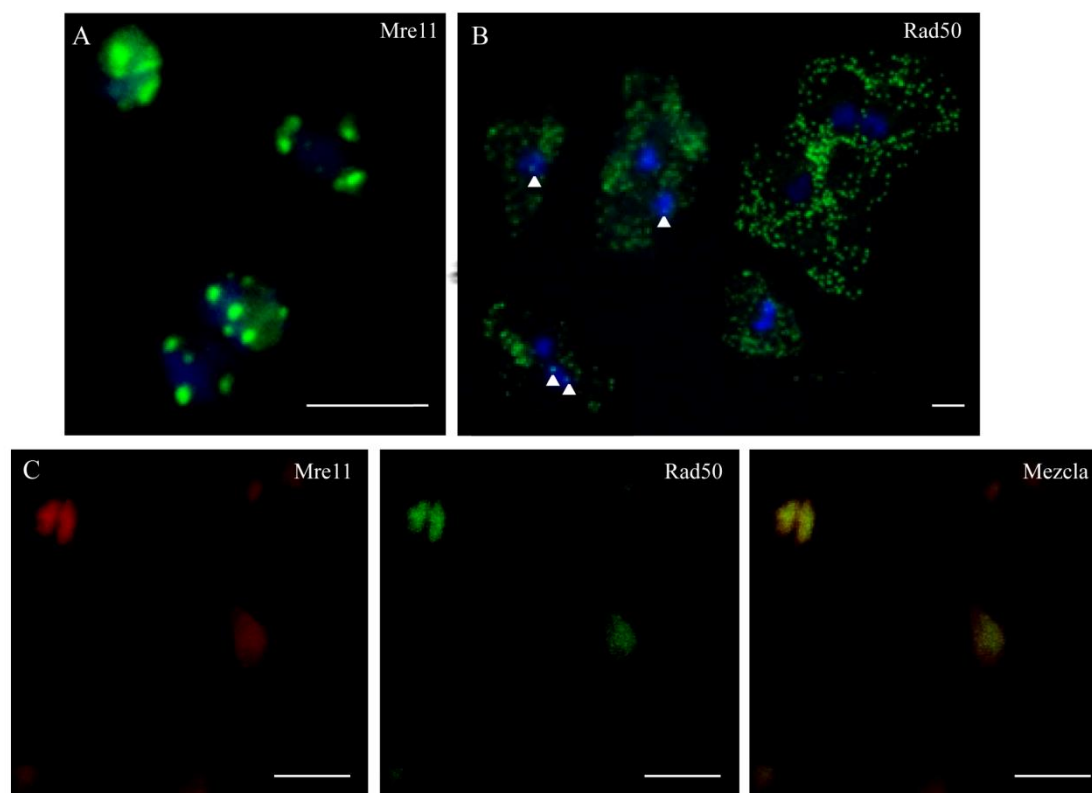


Figura 20. Expresión celular de las proteínas Mre11 y Rad50. **A.** Expresión nuclear de Mre11 en *foci* en células AX4 cuando se transfectan con la construcción pdV-cGFP-cTAP:*mre11*. Barra de escala = 5 μ m. **B.** Expresión de Rad50 en células AX4 con la construcción pdVGFPcTAP:*rad50*. La expresión aunque mayoritariamente citoplásmica revela pequeños sitios de expresión en el núcleo (puntas de flecha). Barra de escala = 5 μ m. **C.** Distribución de ambas proteínas por separado cuando se transfectan células AX4 con las construcciones pDBsrXP-6xMyc:*mre11* y pdV-cGFP-cTAP:*rad50*. En el panel de la derecha se muestra la superposición de las imágenes correspondientes a Mre11 y Rad50. La presencia de Mre11 fue detectada con un anticuerpo anti-Myc y un secundario marcado con fluoróforo rojo. Barra de escala = 5 μ m

Por otro lado se realizaron sendas construcciones en el plásmido pLPBLP para intentar obtener cepas *knock-out* para *mre11* y *rad50*, pero no se consiguió tal fin después de haber analizado mediante PCR más de un centenar de clones.

3.2 Rad51

La proteína Rad51 está implicada en el mecanismo de recombinación homóloga de alta eficiencia para reparar las roturas de doble hebra del ADN (DSBs, del inglés *double-strand breaks*) junto a proteínas accesorias como Rad50 y Mre11 [140]. Concretamente Rad51 está implicada en resolver la estructura denominada cruce Holliday. Esta conformación es una estructura ramificada de ADN que contiene cuatro brazos de doble

hélice unidos y se forman tanto en procesos de recombinación genética como en reparaciones de roturas del tipo DSB [141].

Realizamos un alineamiento de secuencia con la proteína humana y se obtiene que la proteína Rad51 de *D. discoideum* presenta un porcentaje del 71% de identidad y un valor de significación de $1e^{-123}$, por lo que al igual que las proteínas Mre11 y Rad50 tienen una elevada tasa de conservación aunque estén tan alejadas evolutivamente estas especies. Hay que destacar que este gen está duplicado, ya que el cromosoma 2 de la cepa AX4 presenta una duplicación invertida de 1,51Mb, la cual contiene 608 genes [142], entre ellos el estudiado.

Al transfectar células AX4 con la construcción pDV-cGFP-cTAP:rad51 (**figura 21A**) buscábamos comprobar si el patrón de expresión era similar al visto en Mre11, pudiéndose asemejar a los cuerpos que buscábamos y que deben estar presentes en esta especie si los fenómenos de recombinación son los encargados de forma natural del mantenimiento de sus telómeros. La visualización de esta expresión por medio de la fluorescencia de GFP en la proteína de fusión así lo confirma (**figura 21B**).

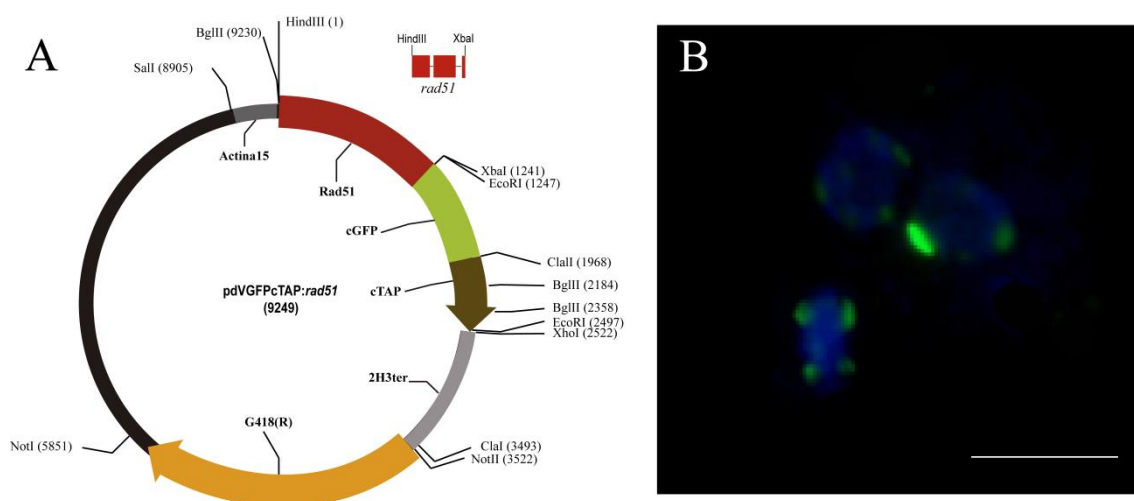


Figura 21. Rad51 se expresa en foci en el núcleo de células AX4. **A.** La expresión de *rad51* está sujeta a la actividad del promotor de actina 15. Se muestran en la construcción la disposición del gen, cGFP, cTAP, el terminador 2H3 y el gen de resistencia a G418. Se indican los sitios de restricción de especial relevancia. En la esquina superior se muestra la estructura del gen *rad51* y los sitios de restricción que flanquean al amplicón obtenido por PCR con los oligonucleótidos descritos en la **tabla 3**. *mre11* presenta tres exones de 414 pb, 593 y 43 pb, separados por dos intrones de 79 pb y 101 pb respectivamente. **B.** La expresión de Rad51 con la construcción pDVGFPcTAP:rad51 en células AX4 produce agrupaciones localizadas y regionalizadas en el núcleo. Barra de escala = 5μm.

rad51 se intentó cotransfectar junto a *mre11* con la construcción pDBsrXP-6xMyc:*mre11* para poder buscar colocalizaciones. El resultado fue que las células no sobrevivían.

3.3 Smc6

La proteína SMC6 pertenece al complejo SMC5/6 cuya función se ha descrito en el mecanismo ALT tanto en células humanas como en levaduras [143-145]. SMC6 que actúa formando un complejo con la proteína SMC5 está implicada en recombinación homóloga y replicación y se localiza en elementos repetitivos como el ADN_r y telómeros, para resolver los intermedios producidos durante la recombinación [146-148]. Dado que los telómeros de *Dictyostelium discoideum* están presumiblemente formados por ADN_r, esta importante relación podría ayudarnos a comprobar si los APBs tienen una relación estrecha con los telómeros en *D. discoideum*. La proteína de *D. discoideum* presenta un 27% de identidad con *H. sapiens* y un 47% de similitud con un valor de significación de $3e^{-92}$.

Se transfectaron células AX4 con la construcción pDM324:*smc6* en la que la proteína Smc6 se fusiona a la proteína roja fluorescente RFP (**figura 22A**). El resultado fue muy parecido a lo observado con las proteínas Mre11 y Rad51, ambos componentes de los APBs en mamífero. La expresión es nuclear y localizada en *foci* (**figura 22B**). Posteriormente se realizaron cotransfecciones de Smc6 con el vector pDBsrXP-6xMyc:*mre11*, pero no se obtuvieron dobles transformantes. Se intentó cotransfectar las células con pDM324:*smc6* y con las construcciones pdV-cGFP-cTAP:*rad51* y pdV-cGFP-cTAP:*rad50*, pero no se observó expresión de las proteínas fusionadas con GFP.

Otra proteína interesante para comprobar su expresión y que menciono aquí, en vez de establecer un nuevo apartado, fue la proteína SuvA o histona H3 lisina 9 metiltransferasa Set1. Esta proteína con un porcentaje de identidad del 33%, de similitud del 47% y un valor de significación de $1e^{-11}$ respecto a la de *H. sapiens* está implicada en la heterocromatinización y silenciamiento telomérico [149], lo que al igual que Smc6, lo hace un reportero de telómeros. Su expresión con la construcción pDM324:*suvA* resultó inapreciable y no analizable.

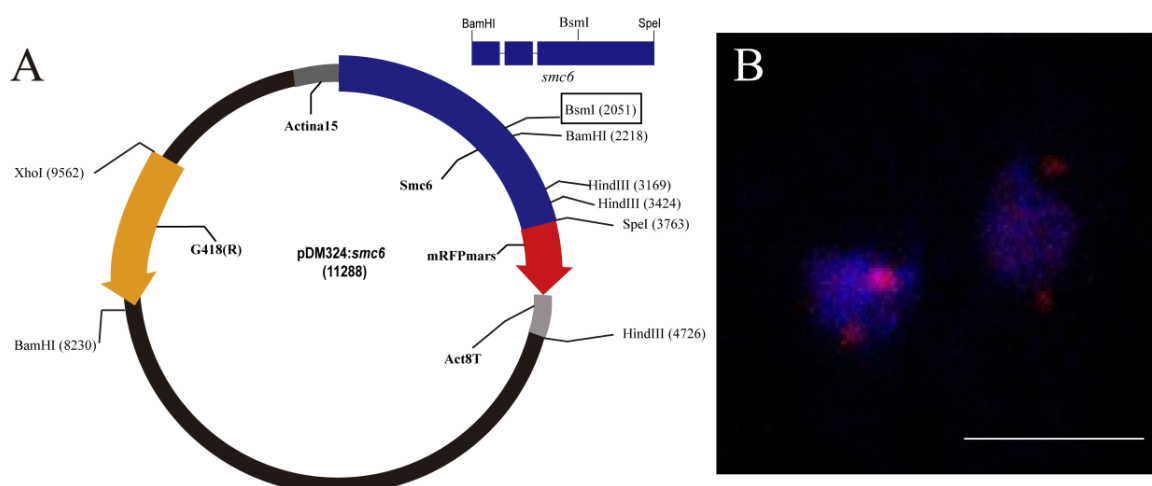


Figura 22. Smc6 se expresa en foci en el núcleo de células AX4. A. La expresión de *smc6* está sujeta a la actividad del promotor de actina 15. Se muestran en la construcción la disposición del gen, mRFPmars, el terminador de actina 8 y el gen de resistencia a G418. Se indican los sitios de restricción de especial relevancia. El sitio BsmI, el cuál fue utilizado para fusionar los dos fragmentos obtenidos por PCR, aparece remarcado. En la esquina superior se muestra la estructura del gen *smc6* y los sitios de restricción que flanquean al inserto obtenido por PCRs con los oligonucleótidos descritos en la **tabla 3**. *smc6* presenta tres exones de 644 pb, 381 pb y 2531 pb, separados por dos intrones de 120 pb y 87 pb respectivamente. B. La expresión de Smc6 fusionada a la proteína roja fluorescente con la construcción pDM324:*smc6* permite observar corpúsculos independientes en el núcleo. Barra de escala = 5 μm.

4. Disquerina

La hipótesis de que elementos de ADNr formen parte de los telómeros de *Dictyostelium discoideum* nos hizo centrarnos en los nucléolos ya que éstos se forman alrededor de los cientos de repeticiones de los genes de ADNr. Además, forman parte del proteoma nucleolar proteínas implicadas en la detección del daño al ADN o en los procesos de reparación [150], como son algunas de las proteínas estudiadas en el apartado anterior. Por ello, estudiamos la disposición de los nucléolos en *Dictyostelium discoideum* y la localización subcelular de una proteína nucleolar, la disquerina, implicada entre otras funciones en el procesamiento del pre-ARNr y de la pseudouridilación de los ARNr [151]. La proteína Dkc1, también llamada Nola4 (del inglés, *Nucleolar protein family A, member 4*) en *Dictyostelium discoideum*, presenta un alto porcentaje de conservación entre especies [152-155]. Al realizar un alineamiento de secuencia con la disquerina humana (**Figura 25**) se obtiene un 78% de alineamiento, un 68 % de identidad y un valor de significancia de prácticamente 0.

Se transfectaron células AX4 con la construcción pDV-cGFP-cTAP:*dkc1* (**figura 23A**), el resultado se muestra en la **figura 23B**. La fluorescencia emitida es nuclear, sin ser ubicua tampoco es tan particulada como se observaba con Mre11, Rad51 o Smc6 (**figuras 20A, 21B y 22B**). La ubicación de los nucléolos en los núcleos de *Dictyostelium discoideum* se determinó por hibridación con una sonda que hibrida con el ARN. La localización de los nucléolos es periférica y bien definida y, generalmente, en un número comprendido entre 1 y 3 (**figura 23C**). Se intentó determinar la posible colocalización de Dkc1 y la sonda nucleolar. De hecho, para este menester se clonó el gen *dkc1* en el vector pDM324 para tener una proteína de fusión con RFP, pero existió una incompatibilidad en la metodología en cuanto a las fijaciones necesarias. La visualización de los nucléolos con la sonda SYTO® RNASelect™ Green Fluorescent Cell Stain requería de una fijación exclusiva e insustituible en metanol, que anulaba la fluorescencia de la proteína de fusión Dkc1-GFP. Pese a este inconveniente, si nos fijamos en la disposición de los nucléolos, parece que disquerina reside en éstos aparte de que pueda hacerlo en otras partes del núcleo.

Realizamos una contranfección en células AX4 con las construcciones pDV-cGFP-cTAP:*dkc1* y pDBsrXP-6xMyc:*mre11* para analizar la posible colocalización de una proteína de reparación y recombinación como es Mre11 con Dkc1, una proteína con localización nucleolar. Como se observa en la **figura 24** y al igual que ocurría cuando se transfectaban juntas Mre11 y Rad50 (**figura 20C**), la localización de ésta primera vuelve a perder su expresión en *foci* (**Figura 20A**), para tener una amplia expresión nuclear. No obstante cuando se hace la mezcla, Dkc1 colocaliza con Mre11 en ciertos territorios del núcleo (**figura 24**)

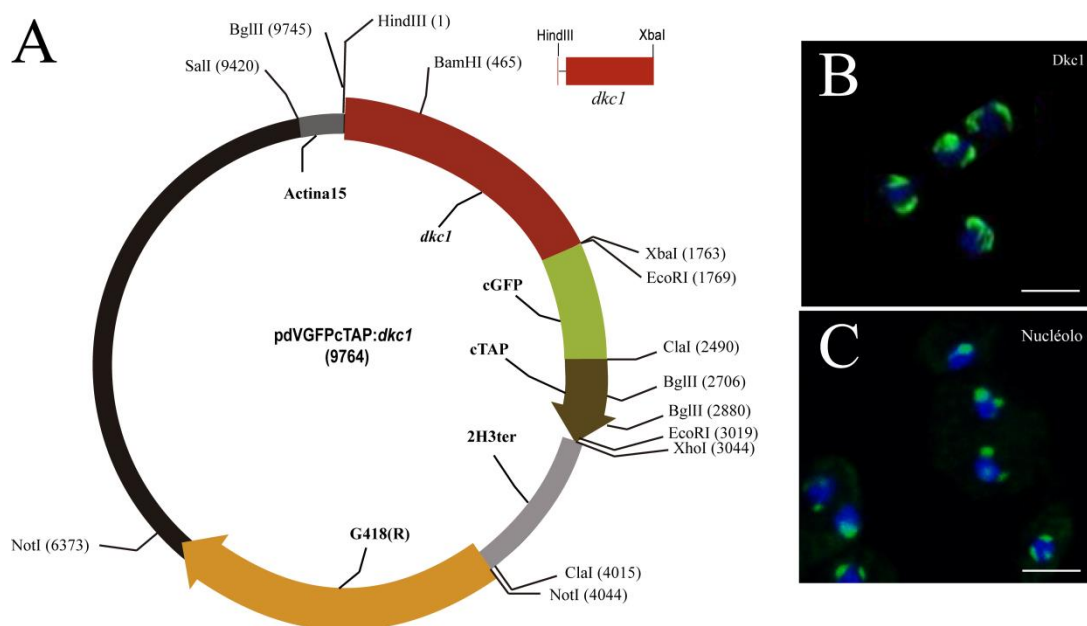


Figura 23. Localización de la proteína de fusión DKC1-GFP y de los nucléolos en *Dictyostelium discoideum*. **A.** Construcción pDV-cGFP-cTAP:dkc1 en la cual la expresión de disquerina está regulada por la actividad del promotor de Actina15. Se muestran en la construcción la disposición del gen, GFP, el terminador de 2H3 y el gen de resistencia a G418. Se indican los sitios de restricción de especial relevancia. **B.** Núcleos teñidos con DAPI donde se observa la localización nuclear de la GFP fusionada a la proteína DKC1. Barra de escala = 5 μ m. **C.** Visualización de los nucléolos en núcleos de células AX4, con una sonda comercial específica de ARN que emite en verde. Barra de escala = 5 μ m.

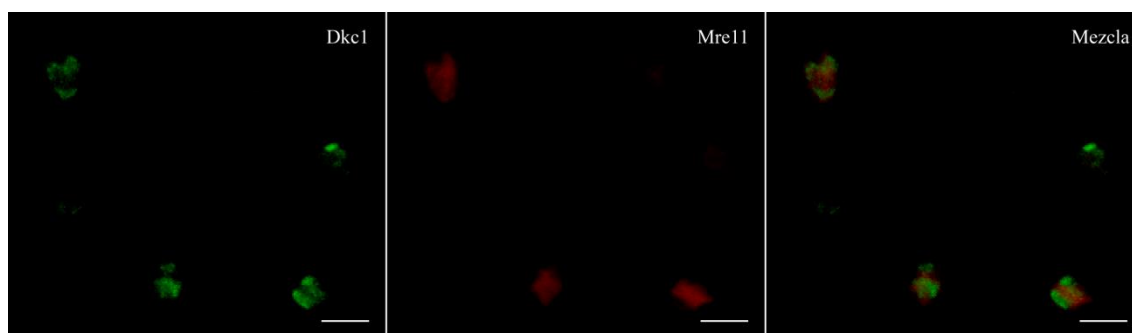


Figura 24. Colocalización de Dkc1 y Mre11 en *D. discoideum*. Presencia de ambas proteínas por separado cuando se transfectan células AX4 con las construcciones pDV-cGFP-cTAP:dkc1 y pDBsrXP-6xMyc:mre11 y la mezcla. La presencia de Mre11 fue detectada con un anticuerpo anti-Myc y un secundario marcado con fluoróforo rojo. Barra de escala = 5 μ m.

5. Modelo de disqueratosis congénita en *Dictyostelium discoideum*

Como se describía anteriormente, la proteína Dkc1 presenta un alto porcentaje de identidad al alinearla con la proteína humana, existiendo aminoácidos clave altamente conservados que al ser mutados desencadenan la enfermedad disqueratosis congénita (Figura 25).

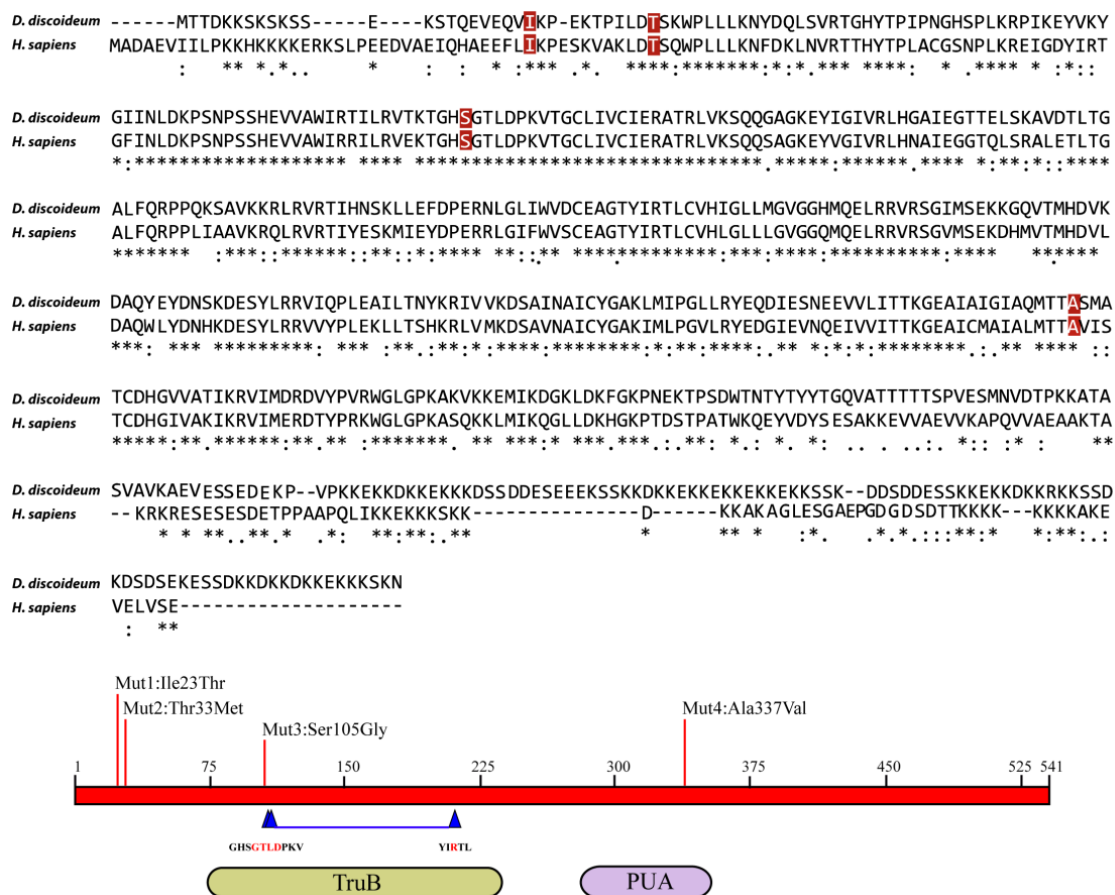


Figura 25. Dkc1 de *D. discoideum* presenta un alto grado de conservación con la disquerina humana. En la parte superior de la imagen se muestra el alineamiento de secuencias entre *D. discoideum* y *H. sapiens*. Los asteriscos (*) indican que en dicha posición los residuos son idénticos, dos puntos (:) indican posiciones en las que se han realizado sustituciones conservativas y un punto (.) indica sustituciones menos conservativas. Los cuatro aminoácidos resaltados en rojo son los aminoácidos que han sido mutados en *dkc1*. En la parte inferior se indican cuáles han sido las sustituciones (Ile23Thr, Thr33Met, Ser105Gly y Ala337Val). Sólo las dos primeras han podido ser introducidas en el genoma en cepas *knock-in* como se expondrá posteriormente. Bajo el esquema de Dkc1 se muestran los dominios TruB y PUA, encargados de convertir los uracilos en pseudouridinas y en la unión al ARN respectivamente. Sobre el dominio TruB se señalizan con triángulos azules, los cinco aminoácidos (GTLD y R) que componen el sitio activo de este dominio y los cuáles son idénticos tanto en *D. discoideum* como en *H. sapiens*.

En la actualidad no se conoce si todos los defectos que se producen por las mutaciones de disquerina se deben a que se compromete la pseudouridinilación de ARNs o a su papel en el mantenimiento de los telómeros [105, 156, 157]. La mayor parte de las evidencias se han obtenido en células de mamífero o modelos animales donde es difícil discriminar entre las dos posibilidades. Por ello, hemos intentado generar un modelo de patología disqueratósica en *D. discoideum* mutando el gen *dkc1* (*knock-in*) y mediante la sobreexpresión de algunas de las mutaciones que producen mayores efectos adversos en humanos.

Se han reproducido cuatro de las mutaciones de aminoácidos conservados que provocan las patologías más graves en humanos, estando asociadas al síndrome de Hoyeraal-Hreidarsson, cuyos pacientes sobreviven durante pocos años. Los cambios se introdujeron por mutagénesis dirigida en el vector de expresión pDV:*dkc618:dkc1*-cGFP-cTAP. Estas mutaciones son Ile23Thr (en Ile38Thr *H. sapiens*), Thr33Met (Thr49Met en *H.sapiens*), Ser105Gly (Ser121Gly en *H.sapiens*) y Ala337Val (Ala353Val en *H.sapiens*), (**figura 25**). Esta última se localiza en el 42% de los pacientes con disqueratosis congénita.

5.1 Caracterización de las cepas que sobreexpresan los mutantes

El primer abordaje fue intentar asemejar lo más posible el modelo transcripcional de disquerina a lo que ocurre de forma natural en la célula, en cuanto a maquinaria proteica transcripcional. Sobreexpresamos *dkc1* en el plásmido pDV-cGFP-cTAP bien bajo el promotor de actina15, propio del plásmido, o bajo la acción de los 618 pb *upstream* al punto +1 del inicio de la transcripción (**Figura 23A y 26A**), que actuaría como el promotor natural de *dkc1*; y cuantificamos qué niveles de disquerina expresaba la célula, sin discriminar de si procedía del plásmido o si era endógena mediante PCR cuantitativa (**Figura 26B**). Analizando estos datos decidimos utilizar como plásmido de sobreexpresión para los mutantes, la construcción pDV:*dkc618*-cGFP-cTAP, ya que elevaba de forma más que suficiente los niveles del ARNm de *dkc1* pero sensiblemente menos que la construcción con el promotor de Actina15. Tenía como añadido la presencia de su propio promotor, el cual estaría sujeto a la misma regulación transcripcional que el gen endógeno.

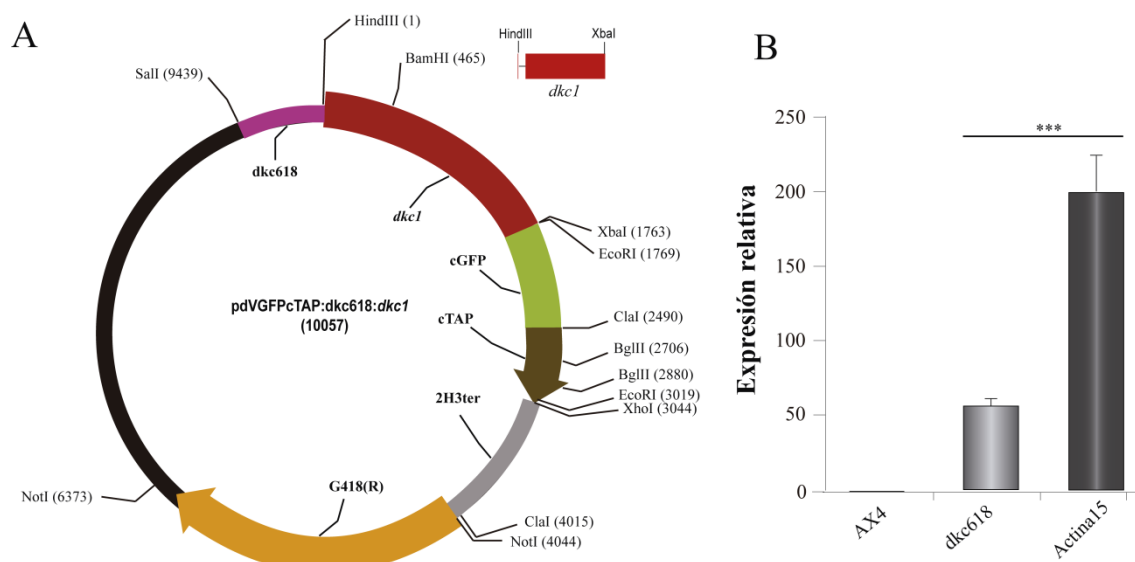


Figura 26. Niveles de expresión de *dkc1* con las construcciones pdV-cGFP-cTAP:*dkc1* y pdV-cGFP-cTAP:*dkc618:dkc1*A. Construcciones que expresan *dkc1* bajo la expresión de los 618 pb que actúan como promotor nativo del gen clonado en el plásmido pdV-cGFP-cTAP. Se muestran en la construcción la disposición del gen, GFP, el terminador de 2H3 y el gen de resistencia a G418. Se indican los sitios de restricción de especial relevancia. **B.** Análisis por PCR cuantitativa de los niveles de ARNm de *dkc1* sin discriminar cuál es la contribución del endógeno y del plasmídico. Se muestran los niveles relativos respecto a la cepa AX4 y normalizados frente a los valores de *rmlA* (gen endógeno). La comparación estadística es frente a las AX4 ***: $p < 0,001$.

A continuación comprobamos qué niveles de disquerina, exclusivamente del plásmido, se estaban sobreexpresando en cada cepa, en comparación con los niveles endógenos de la célula. Considerando nivel endógeno de disquerina aquel proveniente exclusivamente de la transcripción del propio genoma de *Dictyostelium discoideum*. Para ello utilizamos unos oligonucleótidos diseñados, uno en el extremo 3' del gen y el otro en la región que codifica para GFP; por el contrario para diferenciarla de la endógena, los oligonucleótidos se diseñaron en el extremo 3' del gen y en la región 3'UTR (del inglés, *untranslated region*). Como se observa en la **Figura 27A**, la disquerina proveniente del plásmido, independientemente de si ésta es nativa o mutada, se expresa en niveles muy parejos por lo que los fenotipos a estudio no serán dependientes de que una cepa sobreexpresa más disquerina que otra. Por otro lado, la disquerina sobreexpresada desde el plásmido se expresa aproximadamente diez veces más que la endógena (dato no mostrado). El aumento artificial de los niveles de disquerina en la célula provoca que la expresión de la endógena se vea reducida significativamente y aproximadamente a la mitad (**Figura 27B**) en comparación con las

células AX4. En estas circunstancias no sólo la propia célula estaba inundada de las copias que nosotros aportábamos con la construcción sino que además se estaban regulando a la baja sus propios niveles de transcripción de disquerina endógena. Con ésto, podemos considerar que los efectos y observaciones que se analicen a lo largo de esta tesis, dependerán de la disquerina que estemos sobreexpresando en nuestro modelo.

Una de las primeras características a estudio de los mutantes fue ver si el fenotipo de los mismos en patologías humanas era ocasionado por una localización aberrante, disminuida o ausente. Para ello, la observación de la fluorescencia que emitía cada una de las proteínas mutadas con GFP fusionada, nos ayudó a comprobar que su localización es puramente nuclear, regionalizada y sin distinción en cada uno de los mutantes (**Figura 27C**) al igual que la nativa (**figura 23B**).

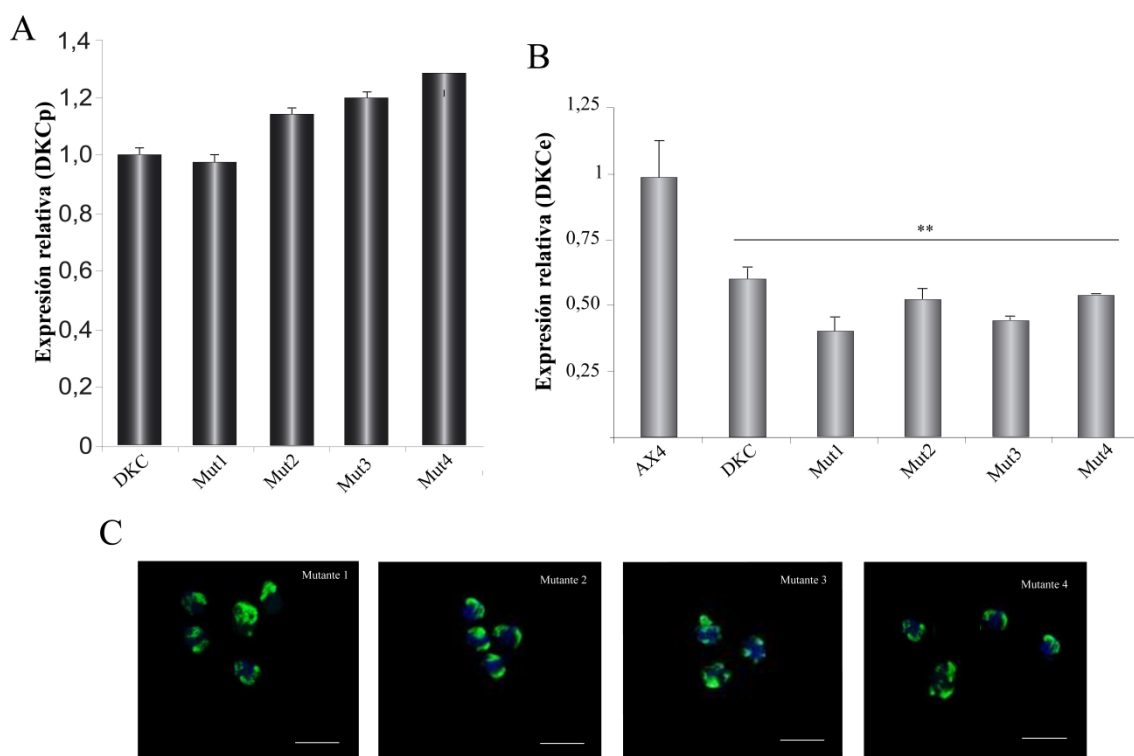


Figura 27. Caracterización de los mutantes de disquerina. **A.** Niveles de disquerina provenientes del plásmido (DKCp) en cada uno de los mutantes relativos a la cepa que sobreexpresa *dkc1* nativa y normalizados frente a los valores de *rlnA*. **B.** Análisis por PCR cuantitativa (qRT-PCR) de los niveles de disquerina exclusivamente endógenos (DKCe). Se muestran los niveles relativos respecto a la cepa AX4 y normalizados frente a los valores de *rlnA* (gen endógeno). La comparación estadística es frente a las AX4 **: $p < 0,01$. **C.** Núcleos teñidos con DAPI donde se observa la localización nuclear de la GFP fusionada a la proteína DKC1 mutada en sus cuatro variantes. La localización de Dkc1 no mutada se mostró en la **figura 23B**. Barra de escala = 5 μ m

Una vez caracterizada la expresión de la disquerina y de sus formas mutantes en el núcleo, quisimos estudiar si existía algún tipo de anomalía respecto al crecimiento y a la velocidad de duplicación de cada una de las poblaciones. Para ello realizamos dos tipos de experimentos para valorar este parámetro. En primer lugar realizamos una serie de curvas de crecimiento donde se realizaron conteos del número de células en cultivo aproximadamente cada 24 horas (**Figura 28A**). Por otro lado, la capacidad fágica de *D. discoideum* sobre ciertas cepas bacterianas como *Klebsiella aerogenes* permite establecer otra manera viable para valorar la velocidad de crecimiento de la cepa a estudio. A los 3 días de plaquear las células sobre bacterias, se contabilizó el tamaño del halo de lisis (**Figura 28B y C**). La **figura 28A** muestra como las cepas que sobreexpresan la disquerina nativa, la disquerina con la mutación 1 y la disquerina con la mutación 3 presentan un número de duplicaciones menor en los tiempos dados que las células AX4. Por el contrario, en el experimento de los halos de lisis sobre cespel bacteriano, son todas las cepas que sobreexpresan disquerina, independientemente de si es una forma nativa o mutada, las que muestran un tamaño medio de halo de lisis inferior al observado en las células AX4 (**figura 28 B y C**).

Dado que la sobreexpresión de disquerina y de sus formas mutantes conlleva una considerable reducción del área del halo de lisis al crecer sobre *K. aerogenes*, creímos interesante analizar cómo era el desarrollo sincrónico de los cuerpos fructíferos y de sus etapas intermedias en ausencia de nutrientes. Este proceso implica activación transcripcional [17] y puesto que disquerina, tiene atribuidas funciones tales como son la pseudouridilación de ARNr, el control traduccional de ARNm específicos [158, 159] y la regulación de un pequeño grupo de microARNs [160, 161]; la relación es estrecha. Como puede observarse en la **figura 29**, el desarrollo en los tres tiempos tomados (15, 19 y 24 horas) en cualquiera de las cepas en comparación con las AX4 es totalmente sincrónico y sin diferencias, a excepción de la sobreexpresión del mutante 2 que parece estar ligeramente adelantado en el tiempo de 15 horas. Pese a esto, en los dos tiempos restantes las estructuras son similares a las que presentan el fenotipo salvaje y el resto de cepas.

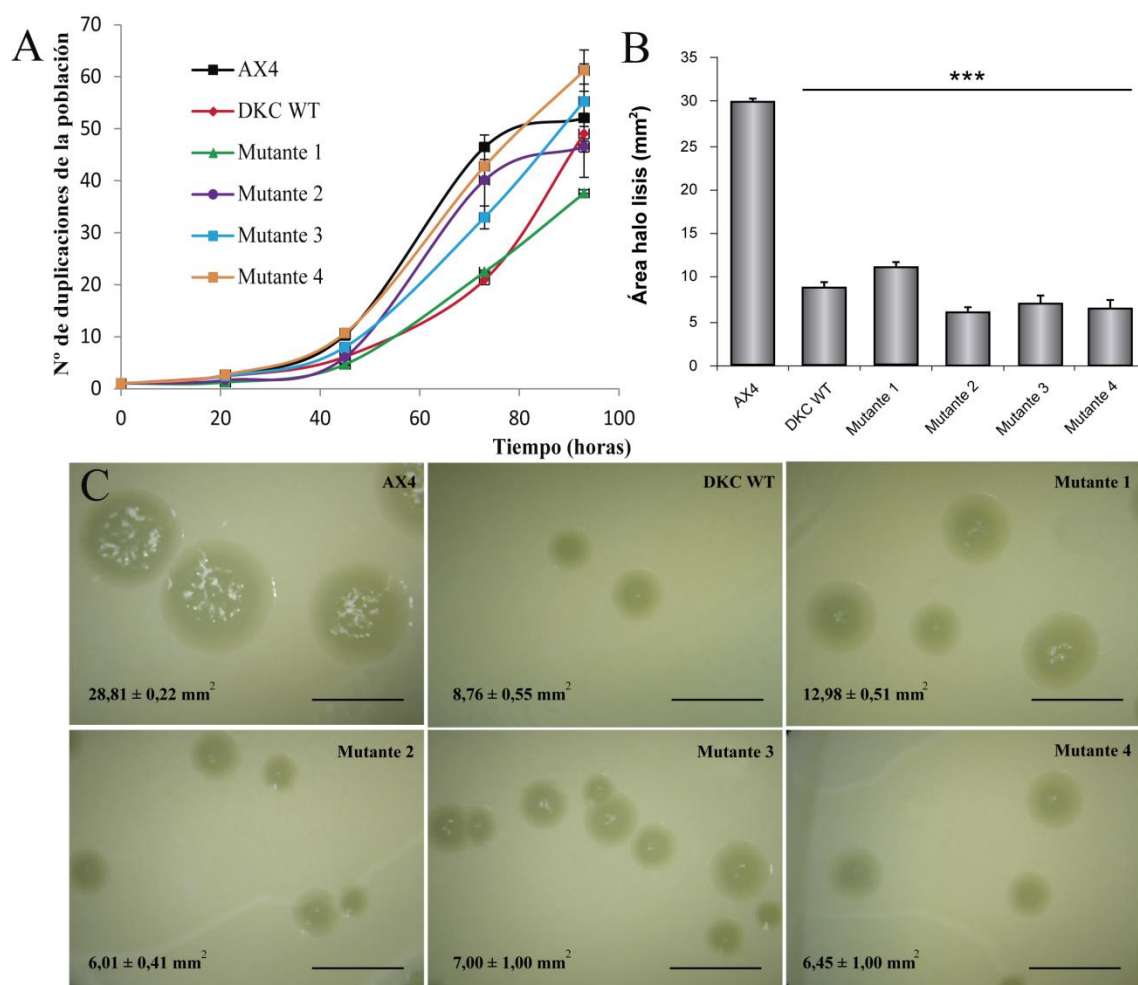


Figura 28. El crecimiento de la cepas que sobreexpresan disquerina está disminuido con respecto a las células AX4. **A.** Datos unificados de dos curvas de crecimiento donde se relaciona el número de duplicaciones de la población con respecto al tiempo en horas. **B.** Gráfico de barras donde se ilustran la media de los datos obtenidos del conteo de 50 halos de lisis de cada una de las cepas. ***: $p < 0,001$. **C.** Muestra representativa del tamaño de halo de cada una de las cepas. En la esquina inferior izquierda se muestra el tamaño medio del área de halo con su desviación estándar. Barra de escala = 5 mm.

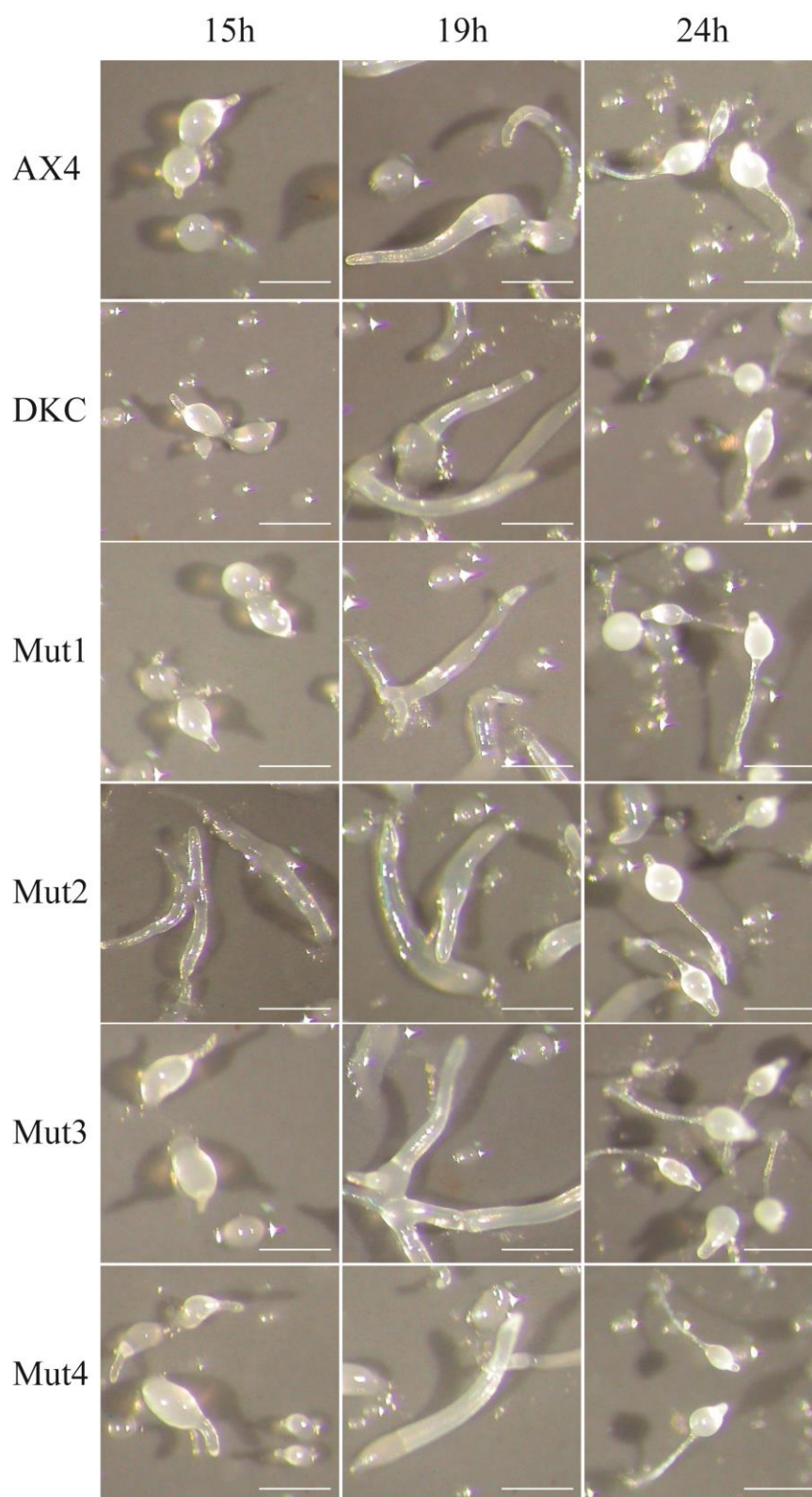


Figura 29: Fenotipos de desarrollo normales. Células AX4 y células sobreexpresando disquerina nativa (Dkc1) y las cuatro formas mutadas (Mut1, Mut2, Mut3 y Mut4), fueron depositadas en filtros de nitrocelulosa para inducir la formación de cuerpos fructíferos. Las fotografías fueron tomadas a los tiempos indicados y con un aumento de 2.5X. Barra de escala = 0,3 mm.

Otra de los aspectos a estudio fue conocer si la expresión de alguna de las proteínas que se asocian con disquerina para que ésta pueda realizar su función están alteradas con motivo de sobreexpresarse una forma mutada de Dkc1. Disquerina en mamíferos participa en tres complejos esenciales, las *snoRNPs* [162] descritas anteriormente, el complejo telomerasa [97], en el cual Dkc1 de *D. discoideum* no participa ya que Tert es afuncional y las ribonucleoproteínas específicas del cuerpo de Cajal (*scaRNPs*, del inglés *specific Cajal body ribonucleoparticles*). En el caso de las *snoRNPs* se asocia con tres proteínas altamente conservadas: NOP10, NHP2 y GAR1 [162]. En *D. discoideum* se llaman también Nola3 (del inglés, *NucleOLar protein family A, member 3*), Nola2 (del inglés, *NucleOLar protein family A, member 2*) y Nola1 (del inglés, *NucleOLar protein family A, member 1*). Sus porcentajes de alineamiento, identidad y similitud al alinearlos con sus homólogos humanos son 96%, 65% y 75% para Nop10; 85%, 41% y 64% para Nhp2; 39%, 48 % y 64% para Gar1. Los valores de significación son $8e^{-14}$, $3e^{-13}$ y $3e^{-19}$, respectivamente. Los resultados de los niveles de expresión de cada una de las proteínas se muestran en la **figura 30**. Lo primero que se observa es que la sobreexpresión de *dkc1*, independientemente de si ésta está mutada, produce una bajada de *gar1* (*nola1*), *nhp2* (*nola2*) y *nop10* (*nola3*).

Comparando la sobreexpresión de cada uno de los mutantes en relación a la cepa que sobreexpresa la disquerina nativa, se observa que es el mutante 3 el que presenta valores más elevados de *nop10* y de *nhp2*. Este último está elevado en el mutante 2 aunque presenta un grado de significación en *nhp2* al límite, $p= 0,049$. Los mutantes 1, 2 y 4 presentan niveles estadísticamente inferiores de *gar1* de los presentes en la cepa que sobreexpresa disquerina sin mutar.

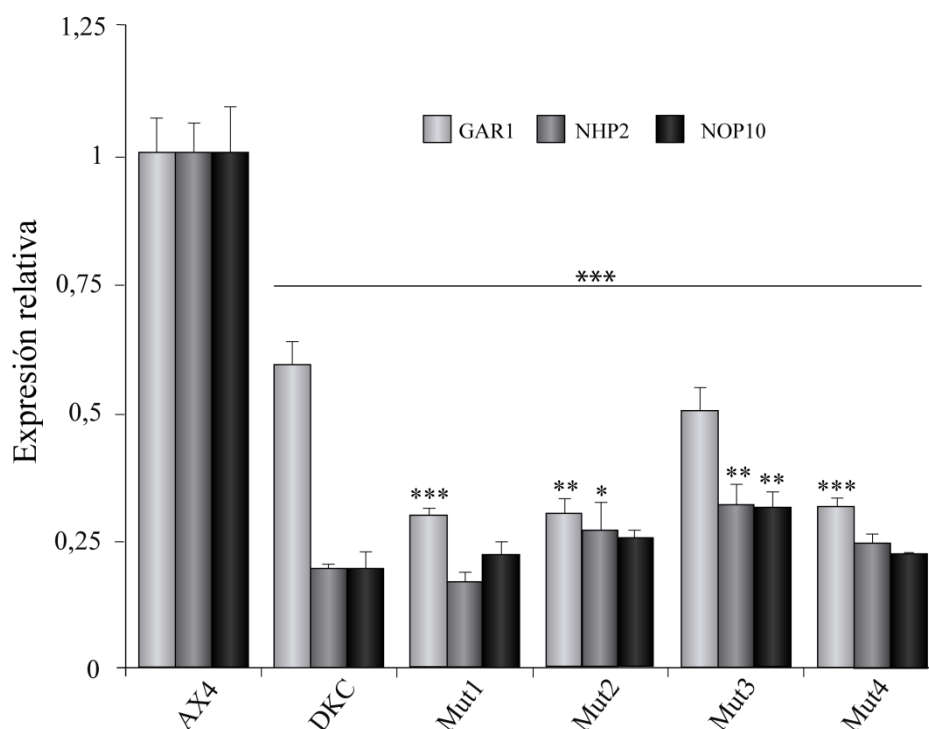


Figura 30. Niveles de *gar1*, *nhp2* y *nop10* de las cepas que sobreexpresan las mutaciones de *dkc1*. Análisis por PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) de los niveles de ARNm de *gar1*, *nhp2* y *nop10*. Se muestran los niveles relativos respecto a la cepa AX4 y normalizados frente a los valores de *rnlA* (gen endógeno). Los niveles de significación que se indican en la parte superior son frente a las células AX4. Los valores de significación mostrados sobre las barras de error son frente a la cepa que sobreexpresa disquerina no mutada (DKC) *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$.

5.1.1 Pseudouridilación

Como introducía al principio de este apartado de resultados, no se conoce si todos los defectos que se producen en disqueratosis se deben a que la disquerina mutada compromete la pseudouridinilación de ARNs o es por su papel en el mantenimiento de los telómeros. La inexistencia de un complejo telomerasa funcional en *Dictyostelium discoideum* nos permitió centrarnos en el papel y las funciones extrateloméricas de *dkc1*. Para este abordaje utilizamos una metodología que nos permitiera discriminar la presencia de pseudouridinas (Ψ) de la de uridinas. Esta se basa en la formación de un aducto entre las Ψ y el compuesto CMCT (N-ciclohexil-N'-b-(4-metilmorfolino) etilcarbodiimido meta-p-tolueno sulfonato) [163]. La formación de este aducto impide la síntesis del ADN complementario (ADNc) por parte de la retrotranscriptasa. Por ello, la pseudouridilación puede ser medida mediante una qRT-PCR, donde a mayor nivel de expresión relativa observado, menor será el nivel de pseudouridilación que presenten

esas células para los ARNs analizados. Esto es así ya que si existe menor número de Ψ , la retrotranscriptasa podrá sintetizar mayor número de copias de ADNc y por ello mayor serán los niveles de expresión relativa.

Se estudió la expresión relativa del *snoRNA* (del inglés, *small nucleolar RNA*) *sno18* y la del ARN ribosomal 26s. Basados en motivos y estructuras conservadas se han identificado en *Dictyostelium discoideum* 18 candidatos a ser *snoRNA*, de los cuales 17 tienen caja C/D, implicados en metilación, y tan sólo uno tiene caja H/ACA (*sno18*). Los H/ACA RNA, conocidos como ARNs guía para la pseudouridilación se asocian con la pseudouridina sintasa (DKC1) y las tres proteínas accesorias (GAR1, NHP2 y NOP10) [164-170]. De éstos se desconoce si están pseudouridilados, por lo que estimamos interesante comprobar como dato adicional la pseudouridilación de *sno18* por los mutantes de *dkc1*. En segundo lugar la formación de las ribonucleoproteínas que portan *snoRNA* como guía, están implicadas en la modificación y en el procesamiento de los ARNr por lo que nos centramos en analizar también el ARN ribosomal 26s.

La **figura 31** muestra que el mutante 2 que porta la mutación Thr33Met, mutación que no está en ninguno de los dominios funcionales identificados (**figura 25**), presenta niveles de retrotranscripción estadísticamente superiores para los ARNs estudiados (*sno18* y 26s) (**Figura 31A**). Esto indica una pseudouridilación comprometida ya que hay menos Ψ , que permiten una retrotranscripción más eficiente. Al existir diferencias entre el mutante 2 con el resto de cepas en lo que se refiere a la pseudouridilación del *sno18*, tenemos como resultado adicional que los H/ACA ARNs en *D. discoideum* se pseudouridilan. También podemos inferir que en base a los resultados mostrados en la **figura 30**, el déficit en la pseudouridilación observado en el mutante dos, no se debe a una disminución en los niveles de *gar1*, *nhp2* ni *nop10*.

Comprobamos si el déficit de pseudouridilación estaba dificultando el procesamiento del pre-ARN ribosomal para originar los diferentes ARN ribosomales (26s, 17s, 5.8s y 5s). Para ello se realizó una qRT-PCR donde los oligonucleótidos para determinar los niveles del preARNr estaban situados en la secuencia ITS2 (del inglés, *internal transcribed spacer*) que separa los ARN ribosomales 5s y 26s y el otro en el 26 s. Para los niveles del 26s los dos estaban diseñados en el propio gen (ver materiales y métodos). La relación entre ambos niveles de expresión refleja que no existe ninguna relación anómala comparando las cepas mutadas con las AX4 y con la que cepa que

sobreexpresa la disquerina sin mutar y que todas ellas procesan el pre-RNAr con igual eficiencia (**figura 31B**)

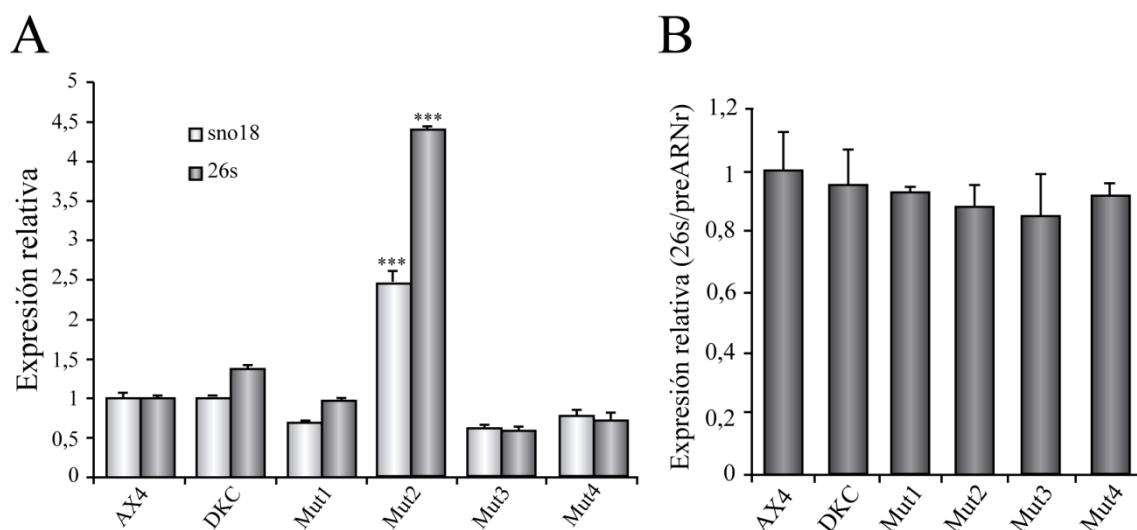


Figura 31. La mutación Thr33Met en *Dictyostelium* compromete la pseudouridilación de los ARN 26s y sno18. **A.** Análisis por PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) de los niveles de sno18 y 26s. Se muestran los niveles relativos respecto a la cepa AX4 y normalizados frente a los valores de los mismos pero sin tratar con el compuesto CMCT. La comparación estadística es frente a las AX4 y frente a la cepa que sobreexpresa disquerina sin mutar (DKC) ***: $p < 0,001$. **B.** Relación de los niveles relativos de expresión obtenidos por qRT-PCR para el ARN ribosomal 26s y el pre-ARNr. Se muestran los niveles normalizados respecto a la cepa AX4

5.1.2 Daño al ADN

Las mutaciones practicadas en disquerina son mutaciones descritas en pacientes que presentan disqueratosis congénita. En esta enfermedad el daño basal al ADN está elevado y muy potenciado cuando se tratan las células con agentes citotóxicos [171, 172]. Aunque existe también bibliografía que pone en entredicho que sea general el daño al ADN en esta enfermedad, ya que depende de cuál es el tipo celular con el que se trabaja o el modelo animal que se utiliza [173]. Por ello, en nuestro modelo, quisimos comprobar el daño al ADN que presentaba cada una de las cepas que sobreexpresaban las mutaciones realizadas en *dkc1*.

Utilizamos para valorar el daño en el ADN los niveles de histona γ H2AX fosforilada en extractos proteicos nucleares mediante *western-blot* ya que esta histona se fosforila en respuesta temprana al producirse roturas de doble hélice en el ADN [174]. Se valoró la fosforilación en condiciones basales o incubando las células durante 3 horas con 5 μ g/mL de bleomicina que produce roturas de doble hélice en el ADN. Este citotóxico es

utilizado para combatir algunos tipos de cáncer como el linfoma de Hodgkin o algunos tipos de carcinoma escamoso ya que produce roturas de doble hélice en el ADN, provocando que la célula frene su ciclo celular y muera por apoptosis.

Como se puede comprobar en la **figura 32A** todas las cepas que sobreexpresan disquerina, independientemente de si ésta es nativa o mutada, presentan niveles significativamente mayores de daño basal que el observado en las células control AX4. Sin embargo, los mutantes 2 y 3 presentan menos daño basal en comparación con la cepa que sobreexpresa la disquerina silvestre. Cuando incubamos estas cepas con bleomicina, de nuevo, todas las cepas exceptuando el mutante 3 presentan un daño superior al de las células AX4. Además, mediante inmunofluorescencia contra la histona se comprobó que el daño era confinado al núcleo al colocalizar exclusivamente con DAPI. De esta forma pudimos comprobar también que el mutante 1 presentó una morfología nuclear hiperplásica con respecto a los núcleos de las células tratadas con bleomicina de la cepa control y de la que sobreexpresa disquerina no mutada (**Figura 32B**). Este comportamiento hipermórfico no lo presentó ninguna otra cepa. Adicionalmente se analizó la multinuclearidad de las cepas. *D. discoideum* en condiciones normales suele tener uno o dos núcleos, siendo la situación más frecuente la mononuclearidad. Quisimos comprobar si existía algún tipo de alteración a este respecto y observamos tiñendo las células con DAPI que la cepa que sobreexpresaba la mutación 3 presentaba un importante número de células, en torno al 15% de las células con tres o más núcleos tanto en situación basal como cuando se le añadía bleomicina. El resto, no presentaba valores extraños reseñables.

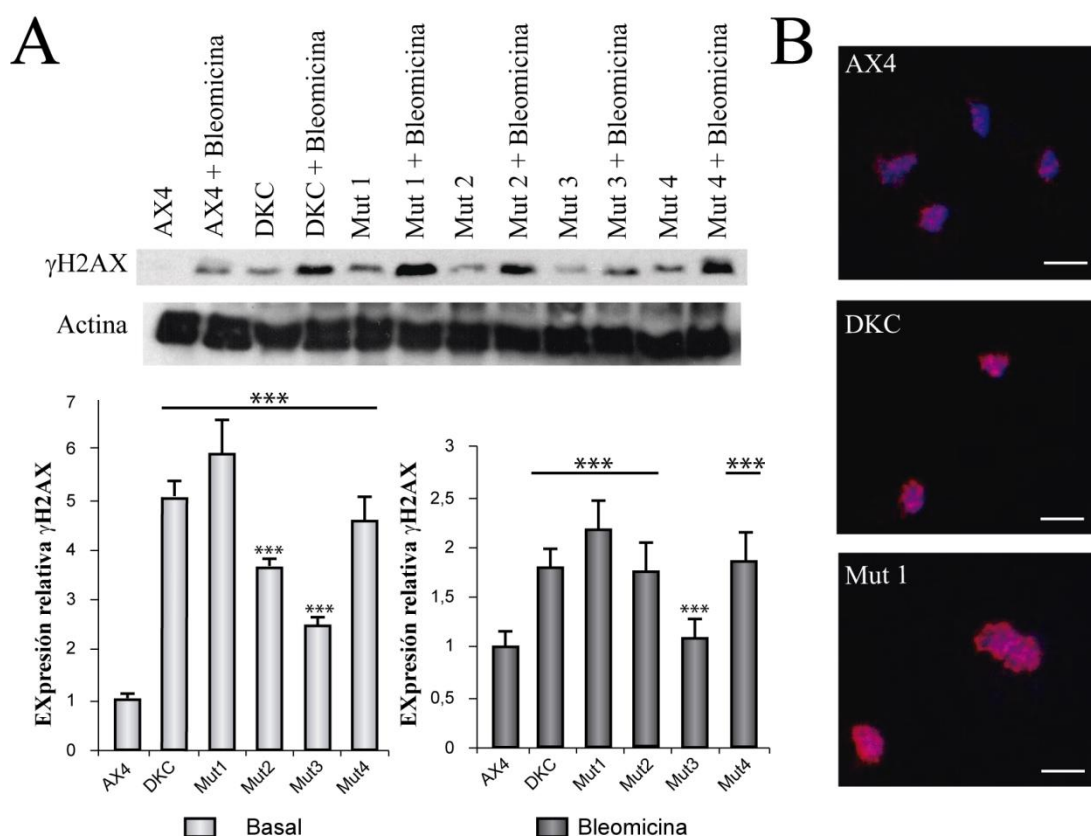


Figura 32. Valoración del daño en el ADN de las cepas que sobreexpresan las diferentes mutaciones de disquerina. **A.** Expresión relativa de los niveles de γH2AX fosforilada mediante *western-blot* y relativos a la cepa control AX4 en condiciones basales o con bleomicina en el medio. Los niveles de significación que se indican en la parte superior son frente a las células AX4. Los valores de significación mostrados sobre las barras de error son frente a la cepa que sobreexpresa disquerina no mutada (DKC). ***, $p < 0,001$. **B.** Colocalización de γH2AX con DAPI (núcleos). Barra de escala = 5 μm

5.2 Caracterización de las cepas *knock-in* para los mutantes 1 y 2

Una vez caracterizados los efectos de sobreexpresar cuatro de las mutaciones más frecuentes de pacientes afectados por la enfermedad DC en células AX4 de *Dictyostelium discoideum*, decidimos reemplazar el gen *dkc1* por uno alterado con cada una de las mutaciones específicas con las que hemos trabajado en el apartado anterior.

Para la obtención de cepas *knock-in* se transfectaron células AX4 con los vectores linealizados pLPBLP: knockin-*dkc1*#1, pLPBLP: knockin-*dkc1*#2, pLPBLP: knockin-*dkc1*#3 y pLPBLP: knockin-*dkc1*#4. En la **figura 33** se muestra simplificado el método de recombinación homóloga utilizado para la obtención de los *knock-in* 1 y 2. De aproximadamente 100 clones analizados para la mutación 3 y otros tantos para la 4 no se obtuvo ningún mutante. Por esta razón se diseñó un nuevo plásmido para la

obtención de los *knock-in* 3 y 4, donde el brazo 5' respecto al casete de blasticidina era el gen *dkc1* con la mutación 3 o 4 y el brazo 3' contenía 1100 pb, 274 pb *downstream* del codón de terminación de *dkc1*. Esto permitía que el terminador de *dkc1* fuese operativo y no se interrumpiese la transcripción del gen adyacente *DDB_G0281931*. Con esta nueva construcción tampoco se consiguió el propósito buscado, tras analizar un nuevo centenar de clones. Podemos estar ante una situación de letalidad al intentar sustituir el gen *dkc1* nativo por el mutado o por el contrario que la tasa de recombinación efectiva para la incorporación de las mutaciones sea extremadamente baja.

Los clones recombinantes se identificaron mediante dos reacciones de PCR. La primera PCR se realizó con dos oligonucleótidos diseñados con secuencias utilizadas para la elaboración de los brazos 5' y 3' respectivamente. Esta PCR nos permite eliminar aquellos clones que no han sufrido recombinación homóloga en el gen *dkc1*. La obtención de un fragmento de 260 pb, indica que no está inserto el casete de blasticidina en el gen *dkc1*. La obtención de un fragmento de aproximadamente 1400 pb indica que o bien el casete está inserto en el gen *dkc1* o que se está amplificando el amplicón por estar inserto aleatoriamente el fragmento linealizado en otra zona del genoma de *D. discoideum*. La siguiente PCR se realiza con aquellos clones seleccionados de la PCR anterior, que daban la amplificación del casete, y con una nueva pareja de oligonucleótidos. Uno de ellos está diseñado fuera de la secuencia utilizada para el diseño del vector, y el otro en el casete de blasticidina. La amplificación de un fragmento de aproximadamente 1300 pb indica que ha existido recombinación y que el casete está insertado en la 5' del gen *dkc1*. Posteriormente a las validaciones por PCR de los posibles *knock-in* para las mutaciones 1 y 2, se secuenció el gen para comprobar que las mutaciones estaban presentes y se delecionó el casete de blasticidina con la expresión de la enzima recombinasa mediante transfección de las cepas mutantes con el plásmido pDEX-NLS-cre [131]

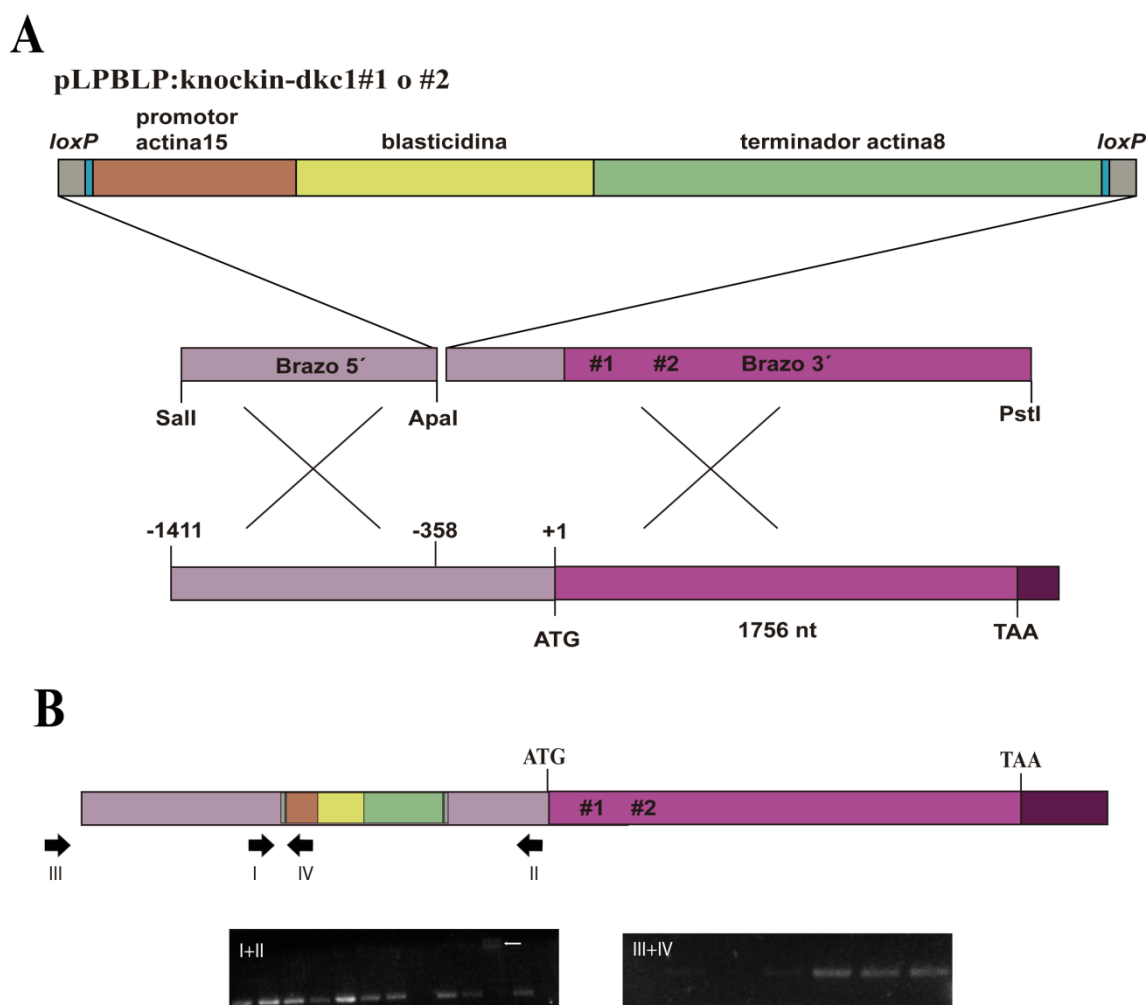


Figura 33. Generación de cepas *knock-in* para el gen *dkc1*. Creación de mutantes *knock-in* para las mutaciones 1 y 2 del gen *dkc1* por recombinación homóloga. **A.** Se muestra el fragmento linealizado de la construcción y los brazos del gen a través de los cuales puede ocurrir la recombinación homóloga. El brazo 3' solo muestra el sitio de restricción PstI, ya que en la elaboración del mismo, el sitio XbaI creado por PCR, se utilizó para el clonaje en el sitio SpeI del plasmido pLPBLP. #1 o #2 **B.** Validación de los mutantes por PCR. Los oligonucleótidos se indican con números romanos y flechas. En el panel de la izquierda se muestra el resultado de la PCR realizada con los oligonucleótidos I y II, donde aquellos clones que amplificaron un fragmento de aproximadamente 1,4 kb (flecha blanca) se utilizaron para elaborar la segunda PCR con los oligonucleótidos III y IV. La amplificación en esta PCR de un fragmento de 1,3 kb es indicativo de que se ha dado recombinación homóloga y que el casete de blasticidina está inserto en el lugar adecuado.

De los mutantes obtenidos, se comprobaron mediante qRT-PCR cuáles eran los niveles de expresión de disquerina y se decidió trabajar con aquellos mutantes que presentaban unos valores parecidos a los de la cepa AX4.

Al igual que realizamos en los mutantes que sobreexpresaban las formas mutadas de disquerina, quisimos comprobar si en estos mutantes existía algún tipo de anomalía en

lo que se refiere al crecimiento y a la velocidad de duplicación. Para ello realizamos conteos del número de células en cultivo cada 24 horas y valoramos la capacidad fágica de los mutantes para crecer sobre césped bacteriano de *K. aerogenes* a las 72 h. (**Figura 34**)

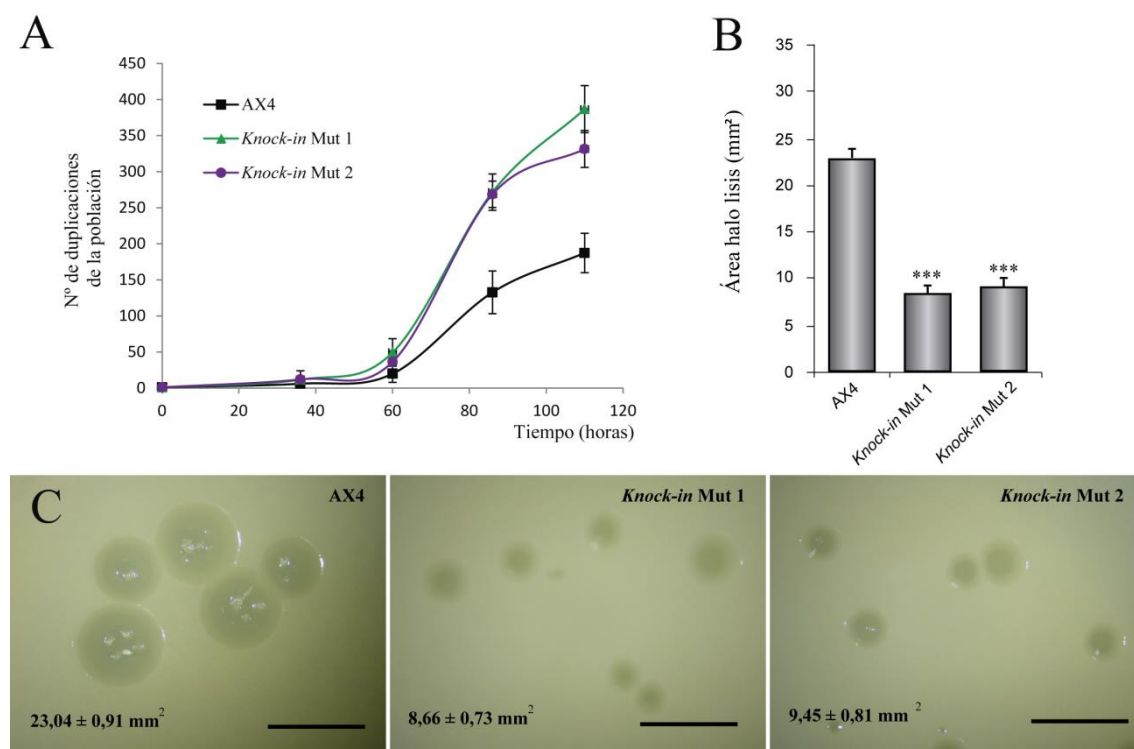


Figura 34. La duplicación poblacional de los *knock-in* está incrementada con respecto a las células AX4 en medio axénico pero los halos de lisis sobre *K. aerogenes* son menores en tamaño. **A.** Datos de un compendio de curvas de crecimiento donde se muestra el número de duplicaciones para cada una de las poblaciones. **B.** Media del conteo del área de 75 halos de lisis para cada cepa. ***: $p < 0,001$. **C.** Muestra representativa del tamaño de halo de cada población. Se muestra el tamaño medio del área junto a su desviación estándar. Barra de escala = 5 mm.

Como se observa en la **figura 34A** el número de duplicaciones de los dos mutantes con respecto a la células AX4 en medio líquido está aumentado aproximadamente el doble, a diferencia de lo que ocurría en las cepas que sobreexpresaban las proteínas mutadas especialmente con la disminución observada en la sobreexpresión del mutante 1 (**Figura 28A**). Sin embargo, el comportamiento observado cuando se plaquean sobre bacterias células de *D. discoideum knock-in* para las mutaciones 1 y 2, es similar al obtenido cuando se plaqueaba cada una de las cepas que sobreexpresaba disquerina mutada o no. En ambos casos el área media del halo de lisis queda reducido a aproximadamente una tercera parte del que presentan las células control AX4.

Puesto que existe una dualidad patente en lo que respecta al crecimiento en medio líquido y sobre bacterias, analizamos el desarrollo sincrónico de los cuerpos fructíferos y de sus etapas intermedias en ausencia de nutrientes. Al igual que ocurría con las cepas que sobreexpresaban disquerina nativa o mutada en comparación con las células AX4 (**Figura 29**), no existió ninguna diferencia ni en los tiempos de desarrollo, ni en la morfología de los culminantes ni de sus estructuras intermedias.

Otro de los aspectos a estudio, dado que disquerina forma parte de un complejo ribonucleoproteico encargado de la pseudouridilación de ARNs, fue valorar si los niveles de ARN mensajero traducibles para cada uno de los integrantes proteicos de este complejo, estaban alterados con respecto a la cepa control AX4. Como se ilustra en la **figura 35** el *knock-in* para la mutación 2 presenta niveles significativamente inferiores para los tres elementos, *gar1*, *nhp2* y *nop10*. El *knock-in* para la mutación 1 presenta niveles estadísticamente similares a los presentes en las células AX4.

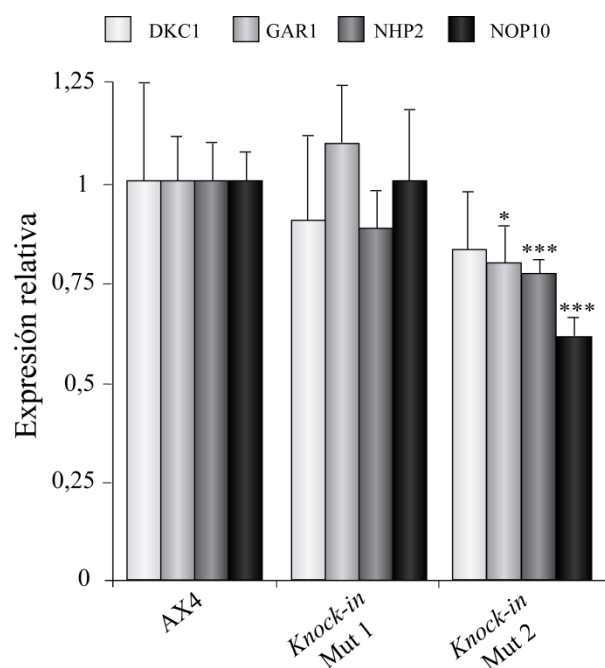


Figura 35. Niveles de *dkc1*, *gar1*, *nhp2* y *nop10* de las cepas *knock-in* con las mutaciones 1 y 2 de *dkc1*. Análisis por PCR cuantitativa (qRT-PCR) de los niveles de ARNm de *dkc1*, *gar1*, *nhp2* y *nop10*. Se muestran los niveles relativos respecto a la cepa AX4 y normalizados frente a los valores de *rnlA* (gen endógeno). La comparación estadística es frente a las AX4. *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$.

5.2.1 Pseudouridilación

Haciendo uso del mismo método utilizado en las cepas que sobreexpresaban los mutantes de disquerina, se analizó si existían variaciones con respecto a los niveles de las células AX4. Para comprobar la pseudouridilación en ninguno de los dos mutantes se observó que hubiera diferencias estadísticamente significativas con respecto a las células control (**Figura 36**). Por ello, una disminución en los niveles de los ARNm de *gar1*, *nhp2* y

nop10, como se observa en el *knock-in* para la mutación 2, parece no ser suficiente como para disminuir la actividad pseudouridina sintasa del complejo disquerina, al menos en los ARN estudiados 26s y sno18.

Este resultado corrobora los resultados de estudios científicos de relevancia que observan que los defectos producidos en células de pacientes con DC se deben al acortamiento telomérico y al daño al ADN y no a defectos en la pseudouridilación de ARNs [105, 156].

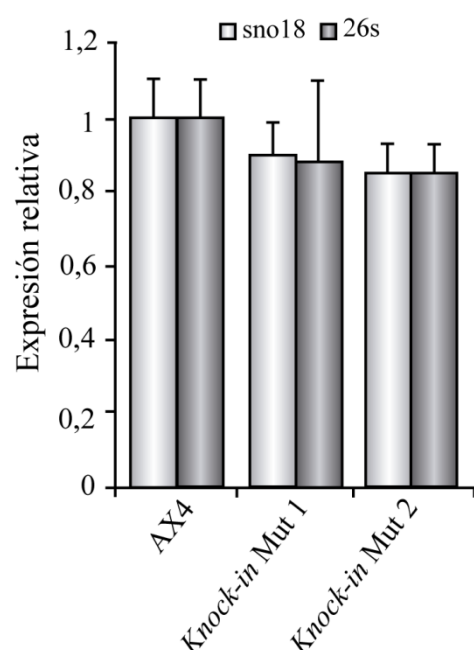


Figura 36. La pseudouridilación en los mutantes para las mutaciones 1 y 2 de *dkc1* no está comprometida. Análisis por PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR) de los niveles de sno18 y 26s. Se muestran los niveles relativos respecto a la cepa AX4 y normalizados frente a los valores de los mismos pero sin tratar con el compuesto CMCT.

5.2.2 Daño al ADN

Las mutaciones presentes en DC provocan que tanto el daño basal al ADN como el presente al ser tratadas las células con compuestos citotóxicos esté elevado con respecto a células de fenotipo salvaje [171, 172]. Quisimos comprobar si nuestros mutantes cumplían con estos hechos. Las células fueron tratadas con bleomicina y como se muestra en la **figura 37** se observó que la respuesta al daño en el ADN, cuantificando los niveles de fosforilación de γ H2AX, estaba elevada en los dos *knock-in* en más del doble con respecto a las células AX4 cuando se trataban con bleomicina.

No se observó una multinuclearidad aberrante en comparación a las células AX4 con o sin tratamiento con bleomicina.

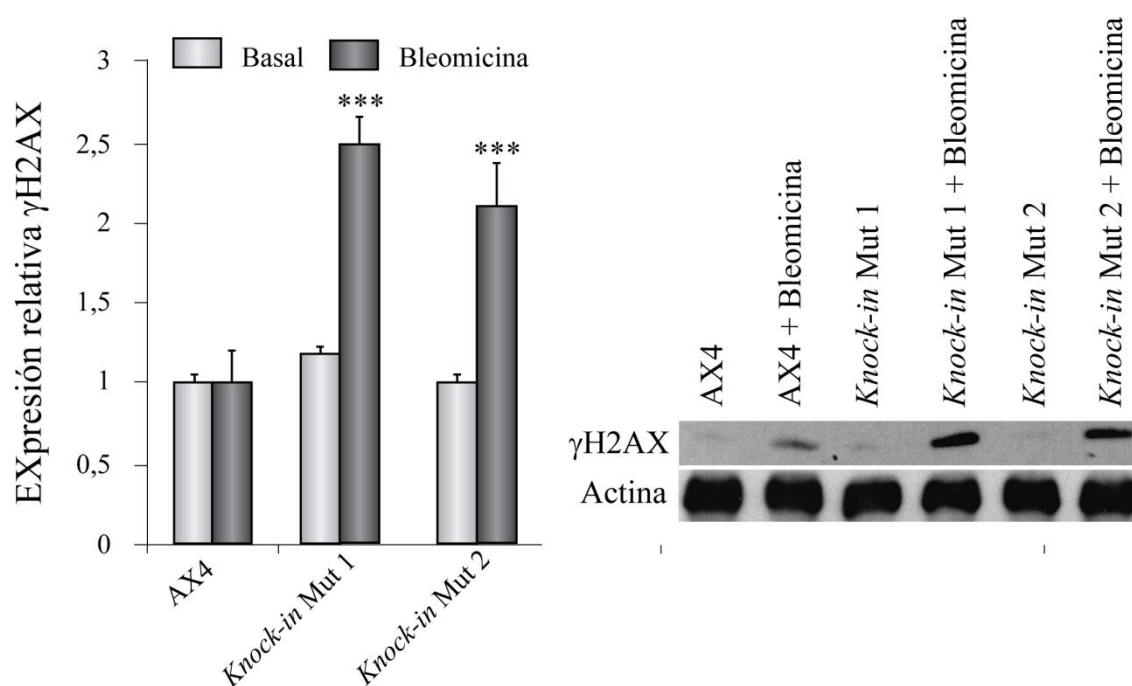


Figura 37. Los mutantes presentan mayor respuesta al daño en el ADN al ser tratadas con bleomicina. Las células fueron tratadas durante 3 horas con bleomicina en el medio de crecimiento axénico HL5. La comparación estadística se hace frente a las células AX4
***: $p < 0,001$

DISCUSIÓN

1. Telómeros

Los extremos de los cromosomas de *Dictyostelium discoideum* presentan copias parciales del elemento de ADN_r extracromosómico, sugiriendo una estructura telomérica nueva. Esto plantea la existencia de un mecanismo común para mantener tanto los terminales del ADN_r como los de los cromosomas [2]. Pese a la presencia de copias parciales de ADN_r en los extremos cromosómicos se desconoce la secuencia que sigue inmediatamente a éstas puesto que se sabe que existen en torno a 10 kb adicionales de secuencia desconocida. El estudio en el que se describía el genoma de *Dictyostelium discoideum* [2] describió doce secuencias no alineadas denominadas “contigs” que representaban uniones entre elementos repetitivos y secuencias parecidas a ADN_r, potencialmente una para cada terminal cromosómico. Por ello, es posible que el extremo desconocido sea el mismo que el extremo que presenta el ADN_r y del cual hasta la fecha no se sabía más de lo que reportaba un artículo de 1981 [31].

Los datos obtenidos en esta tesis muestran la existencia de un extremo monocatenario, de en torno a 700 pb. en la secuencia terminal del elemento extracromosómico de ADN_r. Este saliente de hebra sencilla es característico de los telómeros de eucariotas, sirve para la unión de proteínas teloméricas y está implicado en la formación de los bucle-t y bucle-D al invadir el dúplex telomérico proximal [43]. La hebra-G es rica en guanina y adenina, y la hebra-C complementaria, es rica en citosina y timina. Por otro lado, acorde con la secuencia descrita [31], hemos conseguido secuenciar *upstream* del punto 5' publicado debido a que el oligonucleótido diseñado sentido 5'-3' hibridó en regiones idénticas pero anteriores. Esto hace pensar que es posible que existan más repeticiones. Por otro lado, establecimos la orientación correcta de la secuencia, completando uno de los resultados del artículo en el que nos apoyamos [31]. Finalmente, se observa que tanto la región denominada secuencia satélite como la inmediatamente previa a ésta presentan una heterogeneidad manifiesta en longitud y en secuencia. Esta heterogeneidad plantea la posibilidad de que el mantenimiento de los telómeros en *D. discoideum* se deba a fenómenos de recombinación. La determinación de esta secuencia permitirá diseñar sondas específicas para analizar si está presente en los extremos de los seis cromosomas de *D. discoideum*. También puede ser el primer paso para establecer la secuencia completa del elemento extracromosómico ribosomal.

Dado que los telómeros en diversos organismos juegan el mismo papel esencial en el mantenimiento de los cromosomas, se debería esperar que las proteínas de unión a telómeros estuvieran altamente conservadas, pero no es así [175]. Incluso en una única clase taxonómica como es la de mamíferos, las proteínas teloméricas presentan menos conservación que otras proteínas cromosómicas o factores implicados en la reparación o en la replicación del ADN [175]. En *D. discoideum* no se conoce ninguna proteína de unión a telómero, en gran medida porque no hay estudios al respecto que profundicen en la estructura y la secuencia de los mismos. Buscando candidatos mediante un análisis de homología de secuencia, utilizando como base las proteínas que forman parte del complejo shelterina en mamíferos (TRF1, TRF2, TIN2, POT1, RAP1 y TPP1) y las proteínas que forman parte de los complejos CST (Cdc13, Stn1 y Ten1) y accesorio (Rap1, Rif1 y Rif2), ambos en *S. cerevisiae*, se encontró una proteína que presentaba homología con el dominio de unión al ADN (DBD, del inglés: *DNA Binding Domain*) de las proteínas TRF1 y TRF2. Esta proteína es un factor de transcripción que presenta motivos myb en el DBD. Aunque las proteínas de unión a telómero de diferentes especies normalmente muestran una mínima identidad de secuencia, sí presentan motivos estructurales comunes, en este caso los motivos myb [176-179]. Esto no quiere decir que el factor de transcripción encontrado actúe como proteína de unión a telómero pero podría ser un buen candidato puesto que de existir proteínas de unión a telómero en *D. discoideum* se esperaría que tuvieran DBDs similares a los que presentan las proteínas teloméricas de otras especies.

2. Telomerasa

Los organismos eucariotas poseen la capacidad dual de elongar sus telómeros vía telomerasa o mediante fenómenos de recombinación, pero debido a la alta eficiencia de la vía telomerasa, mayor homogeneidad de los telómeros y/o las restricciones conferidas por la estructura de la cromatina, la elongación por recombinación ocurre solo en condiciones en las que no existe complejo telomerasa o no se expresa alguno de sus componentes. Por ejemplo, la elongación de los telómeros en ausencia del complejo telomerasa se ha demostrado en levaduras, dípteros y humanos [180].

La proteína Tert de *D. discoideum* presenta el dominio retrotranscriptasa interrumpido por un elemento de poliasparaginas que *a priori* debería llevar a pensar que la función retrotranscriptasa está comprometida. El genoma de *D. discoideum* presenta miles de microsatélites con repeticiones de tripletes en los genes que codifican para largos tramos de un único aminoácido [2].

En humano, se han descrito numerosas mutaciones en el dominio retrotranscriptasa de TERT, relacionadas con fibrosis pulmonar, anemia aplásica, disqueratosis congénita, síndrome mielodisplásico y síndrome de Hoyeraal Hreidarsson [181-185]. El *knock-out* generado para *tert* en *D. discoideum*, en el cuál se eliminaron 2300 pb, no presentó ningún defecto ni en crecimiento ni en desarrollo, lo que apoyaría la hipótesis que la proteína no es esencial. No obstante no podemos descartar con esta aproximación que *tert* en *Dictyostelium discoideum* no esté implicada en funciones extrateloméricas que se han descrito en mamífero tales como la regulación de la estructura de la cromatina, la respuesta al daño en el ADN, la síntesis de ARN de doble cadena y la unión a proteínas nucleares [186]. En el citoplasma se ha visto que TERT es capaz de unirse a partículas implicadas en estrés en condiciones no estresantes y participar en diferentes vías de señalización [186, 187]. En la mitocondria participa en la disminución de especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés: *Reactive Oxygen Species*), unión al ADN mitocondrial, aumento de la actividad del complejo I respiratorio y disminución de la apoptosis [186]. Si tuviese alguna función extratelomérica en *D. discoideum* podría explicar que el gen no haya desaparecido con la evolución, como ocurre en el caso de *Drosophila melanogaster* [188]. No obstante, si tuviese algún tipo de función, al sobreexpresar el gen con la construcción pDV-cGFP-cTAP:*tert* se debería haber visto fluorescencia a no ser que los niveles de expresión sean demasiado bajos para ser detectados mediante esta técnica, que directamente no exista transcripción o traducción eficaz o que la célula esté eliminando bien el ARNm o la proteína. Cuando se sobreexpresa el fragmento 5' de *tert*, la apariencia de la fluorescencia parece revelar que la célula lo que está haciendo es intentar eliminarla, ya que no responde a una señalización en concreto y parece acumularse difusa y anormalmente.

3. ALT (*Alternative Lengthening of Telomeres*)

En este trabajo se plantea que el mecanismo de mantenimiento de los telómeros en *D. discoideum* sea parecido al mecanismo ALT que presenta una fracción significativa de las células tumorales. En primer lugar, *D. discoideum* presenta heterogeneidad en la secuencia del extremo del ADN_r que hemos determinado. Esta heterogeneidad se encuentra tanto en la secuencia satélite como en las repeticiones previas a ésta. En células que presentan mecanismo ALT, la distribución del tamaño de los telómeros es altamente heterogénea y los rangos varían desde menos de 3 kb hasta más de 50 kb, [62] en contraste con las células telomerasa-positiva cuyos telómeros presentan un tamaño similar de en torno a 10 kb.

En el mecanismo ALT la recombinación entre telómeros de diferentes cromosomas produce ECTRs (del inglés, *ExtraChromosomal Telomeric Repeats*) al resolverse los bucles-t por la acción de las enzimas de recombinación. En *D. discoideum*, es posible que puedan producirse recombinaciones teloméricas intercromosomales, pero es más probable por abundancia y eficiencia que la recombinación se dé entre los extremos cromosómicos y alguna de las aproximadamente 100 copias del elemento extracromosómico de ADN_r presentes por núcleo. Es posible que exista un mecanismo complementario a éste en el que estén implicados retroelementos o retrotransposones como ocurre en *D. melanogaster*. Los retrotransposones son elementos móviles que amplifican sus secuencias utilizando un ARN intermediario y basándose en un mecanismo de “copia y pega” se integran en un nuevo *locus* o mediante recombinación en un elemento pre-existente [189]. Estos elementos han colonizado la mayoría de los organismos eucariotas. Por ejemplo, el 3% del genoma de *Saccharomyces cerevisiae* está formado por retrotransposones [190], mientras que los porcentajes en humano, ratón y *Drosophila melanogaster* son respectivamente 42%, 37% y 3,6% [191-193]. El genoma de *Dictyostelium discoideum* también es conocido por ser rico en transposones, existiendo retrotransposones del tipo no-LTR (del inglés: *Long Terminal Repeats*) [2, 194].

La última característica de las células con mecanismo ALT es la presencia de los cuerpos nucleares APBs denominados cuerpos promielocíticos asociados con el ALT (del inglés, *ALT-associated promyelocytic leukaemia (PML) bodies*). Estos cuerpos contienen proteínas asociadas a telómeros como TRF1, TRF2, POT1 o RAP1, factores

implicados en la reparación y la respuesta al daño en el ADN como la histona fosforilada γ H2AX o el complejo de mantenimiento estructural del cromosoma SMC5/6 [62, 69, 195]. Existen también proteínas implicadas en recombinación homóloga como la endonucleasa MUS81, la proteína de replicación A (RPA), BRCA1 o el complejo MRN formado por NBS1, MRE11 y RAD50 [62, 69, 195]. En *D. discoideum* la sobreexpresión de las proteínas de fusión Mre11, Rad51 y Smc6 muestra la presencia nuclear de *foci* delimitados y particulados que recuerdan a los APBs presentes en los núcleos de líneas celulares humanas con mecanismo ALT [62]. Dependiendo del tipo celular, la fase del ciclo celular y la etapa de diferenciación el número de cuerpos promielocíticos en células humanas varía entre 5 y 30 [196]. En nuestro caso, con las proteínas mencionadas, el número variaba entre 2 y 10. Podemos explicar esta variación en el número si relativizamos a que estos cuerpos deben de estar en proporción al número de terminales cromosómicos, 92 en humano frente a los 12 de *D. discoideum*, y al tamaño medio del núcleo, 6 μ m frente a las 3 μ m de *D. discoideum*.

El complejo MRN (MRE11, RAD50 y NBS1) es uno de los mayores sensores de roturas de doble hélice en el ADN (DSB, del inglés *Double Strand Breaks*). El complejo está implicado en reparación de DSB, reinicio de la horquilla de replicación del ADN, mantenimiento telomérico y señalización en los puntos de control del ciclo celular [197, 198]. En *D. discoideum* no se ha encontrado ningún ortólogo de la proteína NBS1. El papel que juega NBS1 en el complejo MRN de mamíferos es el de fosforilar el complejo para su activación. La ausencia de un ortólogo de NBS1 indicaría que la pareja Mre11/Rad50 en *D. discoideum*, tendría una activación fosforilación-independiente o que otra quinasa ejerciera el papel de NBS1. Cuando transfectamos las células AX4 con la construcción pDV-cGFP-cTAP:rad50, la expresión mayoritaria y de forma extensa se encontró en el citoplasma (**Figura 20 B**) tal como se ha descrito previamente en determinados cánceres al regularse al alza su expresión [199]. Hay que indicar que un porcentaje significativo de células era gigante y multinucleado en consonancia con la bibliografía consultada [200]. La localización de Rad50, por tanto, puede verse modificada por los niveles de expresión que tenga en la célula. Sin embargo, cuando se sobreexpresan ambas proteínas, la expresión queda confinada al núcleo, desapareciendo el patrón de expresión citoplásmico de Rad50 pero también el corpuscular nuclear de Mre11. Este comportamiento pone de manifiesto el necesario balance que deben tener ambas proteínas para formar complejo, siendo la localización

de Rad50 sensible a una disminución comparativa de los niveles de Mre11. Por otro lado, si bien colocalizan Mre11 y Rad50 en el núcleo, la sobreexpresión de ambas indica que la localización está desregulada en estas condiciones. Por otro lado, con el fin de obtener cepas *knock-out* para ambos genes se realizaron sendas construcciones en el plásmido pLPBLP (construcciones no mostradas), pero no se consiguió ningún mutante después del análisis mediante PCR de más de un centenar de clones. Se sabe que *rad50* y *mre11* son genes críticos para el mantenimiento de la integridad genómica tanto en mamíferos como en levaduras [201, 202], y por ello creemos que es probable que los *knock-out* para estos genes en *D. discoideum* no sean viables.

Otra de las proteínas expresadas y presente en los APBs e implicadas en recombinación homóloga es Rad51 [195]. Al igual que Mre11 su patrón de expresión induce a pensar en la existencia de cuerpos nucleares dada su localización en *foci*. Hay autores que han descrito localización citoplásmica [203-205], aunque los patrones de expresión pueden estar influenciados por variantes de *splicing* alternativo, por la etapa del ciclo celular y por el daño al ADN [206]. *rad51* se intentó cotransfectar junto a *mre11* pero las células no sobrevivían, bien porque no se incorporaba uno de los dos plásmidos que confería la resistencia a la droga de selección o porque la sobreexpresión de las dos proteínas era nociva. Una posible explicación para la segunda situación es, que aunque en algunos tipos de cáncer la sobreexpresión de RAD51 provoca progresión tumoral por desestabilización del genoma [207], generalmente la sobreexpresión es deletérea, a no ser que existan de base defectos en recombinación, en cuyo caso la sobreexpresión de RAD51 revierte la inestabilidad genómica [208]. *D. discoideum* parece resistir la sobreexpresión de Rad51 pero la sobreexpresión de dos proteínas implicadas en recombinación pueden desestabilizar en gran medida la integridad genómica y en consecuencia tener efectos deletéreos para la célula.

La proteína SMC6 forma parte del complejo SMC5/6 el cual está implicado en recombinación homóloga promoviendo y resolviendo los intermediarios de dicha recombinación. Su localización debido a los múltiples sitios de unión al ADN que posee el heterodímero SMC5/6 [209] se encuentra en elementos repetitivos como el ADN_r y los telómeros [146-148, 195]. En células ALT humanas, mutantes para este complejo tienen inhibida la recombinación en los telómeros, produciéndose acortamiento telomérico y senescencia [143]. En el caso de *D. discoideum*, Smc6 se expresa en focos nucleares. La capacidad que tiene la proteína Smc6 de unirse a elementos repetitivos lo

hace un candidato a colocalizar en APBs con los telómeros. En el caso de *D. discoideum* Smc6 podría unirse a las secuencias de ADN_r que se han descrito en los extremos de los cromosomas, pero también es posible que, por su afinidad a secuencias repetitivas, se pueda unir a la secuencia satélite presente en el extremo del elemento extracromosómico ADN_r. Si los cromosomas de *D. discoideum* finalizasen también en las secuencias satélite que presenta este elemento, Smc6 podría unirse en los extremos cromosómicos tanto al ADN_r como a la secuencia GnA, estableciendo puntos calientes de recombinación para el mantenimiento telomérico. Cuando se intentó la colocalización con otro elemento de los APBs como era Mre11, las células no sobrevivieron, al igual que sucedía con la cotransfección de Rad51 y Mre11, posiblemente por el mismo motivo. Las cotransfecciones de Smc6 fusionada a RFP, con Rad51 fusionada a GFP o de Smc6 con Rad50 fusionada a GFP, cuyos plásmidos presentaban la misma resistencia (G418), no mostraron en ninguno de los dos casos fluorescencia verde. Al no haber dos drogas de selección, las células parece que son capaces de mantener aquella construcción menos problemática para su salubridad. Por otro lado, la localización de Smc5, que hubiera permitido comprobar el comportamiento del binomio, no pudo valorarse debido a que el clonaje del gen entrañó numerosas dificultades.

La proteína SuvA o SET1 es una H3K9 metiltransferasa implicada en el mantenimiento de la “barrera” que separa la eucromatina de la heterocromatina, participando tanto en la activación como en la represión transcripcional [210]. En mamíferos la delección de *SET1* provoca defectos en el silenciamiento telomérico y la desrepresión de los genes subteloméricos [210, 211]. En *D. discoideum* se ha descrito que diferentes estados de metilación de la lisina 4 de la histona H3 por parte de Set1 marcan distintas fases del desarrollo [149]. En su ausencia se acelera el desarrollo dándose agregación precoz de las amebas en agregados multicelulares [149]. Dado que la heterocromatinización de los telómeros es característica común en los organismos eucariotas y puesto que SuvA está implicada en esta función, quisimos comprobar si podría estar colocalizando con alguna de las proteínas presentes en los APBs. La sobreexpresión de la proteína no permitió observar fluorescencia quizás porque sus niveles sean difícilmente detectables mediante la metodología utilizada. No obstante, futuras soluciones pueden ser tenidas en cuenta como es la detección directamente de las diferentes marcas de metilación (mono-, di- y

trimetilación) mediante inmunohistoquímica para comprobar su posible colocalización con la batería de proteínas anteriormente estudiadas.

4. Proteínas nucleolares y nucleólo. Disquerina

La hipótesis de que el ADNr sea parte del sustrato telomérico de *Dictyostelium discoideum* nos hizo centrarnos en una región concreta del núcleo, el nucleólo. El nucleólo se forma alrededor de los cientos de repeticiones de los genes que forman el ADNr y comprende un amplio grupo de proteínas, ARNr y cientos de *snoRNAs*. El nucleólo se forma al final de la mitosis y en éste se concentra la maquinaria transcripcional y procesativa del ARNr [212]. En humano se ha descrito que proteínas implicadas en la detección del daño al ADN o en los procesos de reparación del mismo como ATR, BLM, MRE11, PARP, WRN y XRCC1 forman parte del proteoma nucleolar [150]. Es por ello que pensamos que las proteínas anteriormente descritas (Mre11, Rad50, Rad51, Smc6 y SuvA) si forman parte de los procesos de recombinación para el mantenimiento de los telómeros-ADNr, podrían encontrarse en el nucleólo.

Por lo anteriormente descrito estudiamos la disposición de los nucleólos en *Dictyostelium discoideum* y la localización subcelular de una proteína nucleolar, la disquerina. La localización de los nucleólos se determinó mediante hibridación con una sonda específica para el ARNr. Los datos obtenidos indicaron la existencia de 1 a 3 nucleólos por célula, con un tamaño y distribución muy similares a las regiones donde se localiza la expresión de las proteínas Mre11, rad51 y Smc6 fusionadas a GFP o RFP.

Disquerina forma parte de diferentes complejos, siendo parte de las ribonucleopartículas nucleolares pequeñas H/ACA (*H/ACA snoRNP*, del inglés *H/ACA small nucleolar ribonucleoparticles*) presentes en el nucleólo [162] y encargadas de la pseudouridilación de los ARNr y del procesamiento de los pre-ARNr [151]. Por otro lado, DKC1 o sus ortólogos forman parte del complejo telomerasa en los organismos que mantienen el tamaño telomérico mediante este complejo ya que es necesaria para la estabilización del componente ARN y para el ensamblaje del complejo. En *D. discoideum*, pensamos que no interacciona con Tert, pero por su papel en el procesamiento y maduración de los ARNs, pensamos que puede ser otro candidato que si bien no participa en los

fenómenos de recombinación si puede ejercer un papel de señalización desconocido en los telómeros, en una situación complejo telomerasa independiente.

La localización de disquerina en *D. discoideum* es nucleolar, aunque la fluorescencia observada parece ser más extensa que la disposición de los nucléolos dentro del núcleo. Esto podría ser debido a que Dkc1 se localiza en otras partes del núcleo como son los cuerpos de Cajal encargados del ensamblaje de diferentes ribonucleoproteínas así como de la pseudouridilación de los pequeños ARNs nucleares (*snRNA*, del inglés *small nuclear RNA*) [213]. La colocalización de Mre11 con Dkc1, conlleva de nuevo un cambio en la expresión particulada que presentaba Mre11, pero a diferencia de Rad50, Dkc1 no altera su localización. Dkc1 colocaliza con Mre11 en ciertos territorios del núcleo, lo que indica que ambas proteínas podrían estar colaborando en mecanismos comunes. De hecho, la disminución simultánea de la expresión de ambos genes provoca una disfunción telomérica global en células de mamífero, lo que haría pensar en un mecanismo colaborativo [214].

5. Disqueratosis congénita

Uno de los principales problemas para poder investigar la etiopatología de ciertas enfermedades, es el material vivo del que se dispone. En numerosas ocasiones, las células obtenidas de pacientes enfermos crecen mal y a menudo impiden tener una masa crítica para obtener material con el que investigar. En otras ocasiones existen mutaciones descritas en pacientes de los que no se ha podido obtener células. Es por ello la necesidad de trabajar con modelos animales y celulares, que reproduzcan las mutaciones a estudiar. En ocasiones hay que buscar organismos evolutivamente separados del ser humano ya que permiten estudiar rutas bioquímicas y mecanismos afectados que no son deletéreos en estos modelos. *D. discoideum* ofrece un número importante de ventajas como organismo modelo. Un gran número de células puede ser crecido en laboratorio para posterior análisis bioquímico y estudios de biología celular. Además, *D. discoideum* es un organismo haploide en el cuál la interrupción de genes o la mutación de los mismos por recombinación homóloga es más sencilla. La publicación completa del genoma [2] y sus recursos asociados (dictybase.org) han reforzado a *D. discoideum* como modelo.

En el caso de mutaciones en el gen *DKC1* humano relacionadas con disqueratosis congénita, existen 14 líneas celulares depositadas en el *Coriell Cell Repository* de las cuales algunas suelen tener problemas para mantenerse en cultivo experimental como la línea X-DC 1774-P [104, 156]. Por otro lado, existen líneas establecidas como la línea de fibroblastos de ratón F9-A353V [215, 216]. De las mutaciones descritas en enfermos con disqueratosis congénita no se tiene claro si los defectos observados se deben a que la pseudouridilación de ARNs está comprometida o al papel que tiene disquerina en el mantenimiento de los telómeros por formar parte del complejo telomerasa [105, 156, 157].

En *D. discoideum* hemos establecido un modelo de disqueratosis congénita con dos abordajes. Por un lado, hemos sobreexpresado cuatro mutantes de *dkc1* con mutaciones homólogas a las descritas en humano y por otro, hemos trabajado con cepas *knock-in* para dos de estas mutaciones. La **tabla 9** resume los resultados obtenidos con los dos abordajes.

La sobreexpresión de *dkc1*, independientemente de si ésta está mutada o no, provoca una disminución en los niveles de expresión de *dkc1* endógena posiblemente por medio de una retroalimentación negativa en donde los sensores celulares interpretan que hay suficientes niveles efectivos disminuyendo la transcripción endógena. De esta forma el gen mutado que estamos sobreexpresando tiene mayor ponderación y representatividad en la célula pudiendo estudiarse los efectos derivados de éste. Los *knock-in* mantienen la misma carga efectiva de *dkc1* mutada que la *dkc1* silvestre observada en células AX4. De esta manera, los efectos vistos son atribuidos a la propia mutación y no a niveles de expresión desregulados.

Los resultados obtenidos en esta tesis indican que la sobreexpresión de *dkc1*, estimada en unas 50 veces el nivel fisiológico, produce diversos efectos sobre la funcionalidad celular. Las células presentan menor crecimiento, menor expresión de genes que codifican para la propia disquerina y las proteínas asociadas Gar1, Nhp2 y Nop10 y mayor daño al ADN, tanto basal como inducido por tratamiento con bleomicina. La sobreexpresión de *dkc1* no altera, sin embargo, la pseudouridilación de ARNs, el procesamiento del pre-ARNr ni el proceso de desarrollo del cuerpo fructífero.

		Sobreexpresión de los mutantes				Cepas <i>knock-in</i>	
		Mut1	Mut2	Mut3	Mut4	Mut1	Mut2
Niveles de ARNm	<i>dkc1</i> endógena	↓ —	↓ —	↓ —	↓ —	—	—
	<i>gar1</i>	↓ —	↓ ↓	↓ —	↓ ↓	—	↓
	<i>nhp2</i>	↓ —	↓ ↑	↓ ↑	↓ —	—	↓
	<i>nop10</i>	↓ —	↓ —	↓ ↑	↓ —	—	↓
Crecimiento	Axénico	↓ —	— ↑	↓ ↑	— ↑	↑	↑
	Halos de lisis	↓ —	↓ —	↓ —	↓ —	↓	↓
Desarrollo		— —	— —	— —	— —	—	—
Pseudouridilación		— —	↓ ↓	— —	— —	—	—
Procesamiento del preARNr		— —	— —	— —	— —	—	—
Daño al ADN	Basal	↑ —	↑ ↓	↑ ↓	↑ —	—	—
	Bleomicina	↑ —	↑ —	— ↓	↑ —	↑	↑

Tabla 9. Resumen de los datos obtenidos en el desarrollo de un modelo de disqueratosis congénita para diferentes mutaciones del gen *dkc1* en *D. discoideum*. En el caso de la sobreexpresión de los mutantes, para cada celda, el triángulo superior muestra la comparativa con las células AX4; en el inferior con la cepa que sobreexpresa *dkc1* no mutada.

En relación al crecimiento y la proliferación, las cepas que sobreexpresan *dkc1* mutada o sin mutar, presentan un crecimiento inferior posiblemente por la merma del 70% en los niveles de los componentes del complejo disquerina en relación a los de células AX4. En *D. discoideum* se han descrito situaciones parecidas en las cuales la sobreexpresión de una proteína dificulta la tasa de proliferación, por alterar la homeostasis del sistema [217, 218].

Una de las características que está bien establecida en las células de pacientes que presentan la enfermedad es que el daño al ADN está elevado en situación basal y

potenciado cuando se tratan las células con agentes citotóxicos [171-173, 219]. En *D. discoideum* el mero hecho de sobreexpresar *dkc1* aumenta los valores de γ H2AX fosforilada en unas cinco veces reflejando un aumento del daño en el ADN. La sobreexpresión de disquerina como se ha descrito anteriormente está produciendo una saturación del sistema que provoca una retroalimentación negativa que disminuye los niveles de los componentes del complejo disquerina. Es probable que este desajuste altere los niveles de los complejos ribonucleoproteicos de los cuales forma parte disquerina (*H/ACA snoRNPs* y *scaRNPs*) creándose un efecto cascada que genera inestabilidad genómica y por tanto daño basal al ADN. Estos datos ponen de manifiesto la importancia de que las células tengan unos niveles regulados de expresión de *dkc1*. De hecho, es tan importante el mantenimiento de los niveles de proteína celular que elevados niveles de disquerina están implicados en la malignidad de ciertos tumores. Hasta tres veces está elevada en hepatocarcinoma y cáncer de colon [220, 221], 1.5 veces en cáncer de próstata [222] y entre 3 y 12 veces en cáncer colorrectal [223]. Disquerina es la diana transcripcional directa de c-Myc lo que relaciona estrechamente la proliferación celular con la sobreexpresión de disquerina [224, 225].

La sobreexpresión de las proteínas Dkc1 mutadas produce muchas de las alteraciones descritas para la sobreexpresión de la proteína no mutada, con algunas diferencias reseñables. El primer bloque proclive a estar alterado en los enfermos de disqueratosis es la pseudouridilación por el papel que tiene disquerina en esta función [164-170]. Del conjunto de mutantes y abordajes la sobreexpresión del mutante 2 provoca una disminución de la pseudouridilación en los ARNs estudiados, sno18 y 26s, sin que esto conlleve a una disminución en la maduración del preARNr. Esta mutación, Thr33Met homóloga a la mutación Thr49Met humano, [226] no se encuentra en ninguno de los dominios funcionales de disquerina y provoca disqueratosis congénita recesiva ligada al cromosoma X y síndrome de Hoyeraal Hreidarsson. Es probable que la mutación 2 provoque defectos en la pseudouridilación debido a que existe una disminución en los niveles de las proteínas accesorias que forman el complejo disquerina: Gar1 (Nola 1), Nhp2 (Nola 2) y Nop10 (nola 3) (**figura 35**) y que si no existe sobreexpresión de esta proteína mutada, la afección no sea crítica y por tanto tamponada por la célula (**figura 36**). Esta situación en la que la mutación de una proteína provoca la disminución de los niveles de otro componente en estrecha relación, ya ha sido descrito en el complejo telomerasa. Por ejemplo, mutantes de NOP10 y de disquerina disminuyen los niveles

del componente TERC [227, 228]. La disminución en los niveles de los componentes del complejo disquerina es posible que sea porque la mutación 2 esté afectando a la unión de Nop 10, ya que es la que presenta menores niveles de expresión (**figura 35**). La unión de la proteína NHP2 es dependiente de que previamente se haya unido el binomio DKC1/NOP10 [101], mientras que la unión de GAR1 a DKC1 es independiente de cualquier otra unión [229].

Los niveles de estas proteínas cuando se sobreexpresa *dkc1*, independientemente de si ésta está mutada, se regulan a la baja lo que hace pensar que el sistema está saturado y se está generando un ciclo de retroalimentación negativa. La variación de los niveles de *gar1*, *nhp2* y *nop10* al alza o a la baja en la sobreexpresión de los mutantes en comparación con la cepa que sobreexpresa *dkc1*, difícilmente puede ser explicado desde un punto de vista unilateral y específico. En la célula se está dando la coexistencia de proteína *dkc1* endógena y proteína *dkc1* mutada, una retroalimentación negativa, un aumento de niveles potencialmente dañinos como veremos en el estudio del daño al ADN con la histona fosforilada γ H2AX y una saturación del sistema. Todo esto debe y ha de estar influyendo en los niveles de expresión observados. No obstante en ninguno de los abordajes, ni el desarrollo de culminantes ni la agregación están alterados por lo que las vías de señalización implicadas y las interacciones célula-célula no son consecuencia ni efecto de los modelos planteados y por tanto disquerina no está implicada en estos procesos.

El segundo abordaje para el estudio de los mutantes fue la generación de cepas en las que las mutaciones se incorporaran al gen *dkc1* endógeno (cepas *knock-in*). Desgraciadamente, solo pudimos generar estas cepas para las mutaciones 1 y 2. Al estudiar el efecto de las cepas *knock-in* se revela una dualidad manifiesta. Por un lado, presentan un aumento en el número de duplicaciones de la población pero una disminución en el tamaño de los halos de lisis. Se han descrito alteraciones del crecimiento en células que presentan mutaciones para disquerina [225, 230, 231] y aunque disquerina interactúa con múltiples ARNs con caja H/ACA implicados en la biogénesis de ribosomas, *splicing* de ARNm y posiblemente otros procesos, generalmente los defectos en crecimiento se deben a su papel en el complejo telomerasa por parada del ciclo celular al alcanzarse un acortamiento crítico de los telómeros [171]. Por otro lado, los pacientes con disqueratosis congénita presentan una alta susceptibilidad de padecer cáncer ya que el acortamiento crítico de los telómeros

conlleva un incremento de inestabilidad genómica que genera células malignas [232, 233]. En *D. discoideum*, no existe complejo telomerasa, por lo que *a priori*, el acortamiento telomérico no sería debido a este mecanismo y tampoco defectos en la tasa de proliferación. Por un mecanismo aún desconocido los *knock-in* para las mutaciones 1 y 2 tienen una tasa de proliferación descontrolada y un tamaño celular menor lo que puede plantear que aún con una elevada tasa de duplicación los halos de lisis sean inferiores. Esto indica que los enfermos de disqueratosis congénita aparte de la susceptibilidad al cáncer, fruto de la inestabilidad genómica por un complejo telomerasa deficiente, también podrían desarrollar cáncer, por un mecanismo telomerasa-independiente debido a mutaciones en *dkc1*.

La cepa *knock-in* para la mutación 2 presenta una reducción en los niveles de expresión de los genes *gar1*, *nhp2* y *nop10*, como sucedía en las cepas de sobreexpresión. En cambio, la cepa *knock-in* para la mutación 1 no presenta alteraciones en los niveles de expresión de estos genes.

En lo que respecta a la pseudouridilación de ARNs, estaba disminuida en la cepa que sobreexpresaba la mutación 2. Esta disfunción en la pseudouridilación no se observa en el *knock-in* para la misma mutación, lo que plantea que aunque la mutación pueda influir de forma negativa en la pseudouridilación, son importantes los niveles de expresión que alcance la célula.

Una característica común de las cepas que sobreexpresan *dkc1*, con o sin mutaciones, fue el aumento al daño del ADN. Únicamente la sobreexpresión de la mutación 3 muestra menor daño que la cepa que sobreexpresa *dkc1* no mutada. Aún en estas condiciones el daño tanto basal como con bleomicina es superior al de las células control AX4. Esta mutación está localizada en el dominio Trub de disquerina. Es posible que esta región sea necesaria para producir el aumento en la señalización del daño en el ADN descrito en el resto de mutantes y con la proteína sin mutar. En el caso de los *knock-in* el daño diferencial al ADN solo se observa cuando las células son tratadas con bleomicina, pero no en condiciones basales donde los niveles de γ H2AX fosforilada son similares a los de células AX4. *D. discoideum* exhibe una gran tolerancia al daño en el ADN. Por ejemplo, más del 10% de células en cultivo son capaces de sobrevivir a 300 kilorads de radiación ionizante y regenerar el cultivo con el tiempo [234]. Las diferencias se observan cuando tratamos las células con bleomicina.

Los niveles de γ H2AX están incrementados en los *knock-in* con respecto a las células control AX4. El aumento del daño tanto en las cepas de sobreexpresión como en las *knock-in* revela un papel extratelomérico de *dkc1* en la respuesta al daño al ADN mediada por γ H2AX. Esta observación es novedosa porque en células de mamífero el daño al ADN siempre se ha asociado al acortamiento telomérico. Dado que nuestro estudio sugiere que disquerina no participa en la extensión de los telómeros en *D. discoideum*, este organismo podría ser un buen modelo para estudiar el daño al ADN inducido por mutaciones en disquerina de forma independiente al tamaño de los telómeros.

CONCLUSIONES

1. El extremo del elemento de ADNr extracromosomal de *D. discoideum* presenta una cadena rica en citosina y otra rica en guanina que se extiende en un extremo 3' monocatenario responsable de heterogeneidad en la secuencia y el tamaño.
2. La disrupción del gen *tert* en *D. discoideum* no produce ningún fenotipo apreciable.
3. Mre11, Rad51 y Smc6 forman corpúsculos nucleares en *D. discoideum* similares a los APBs presentes en células de mamífero con ALT.
4. La proteína Dkc1 de *D. discoideum* tiene alta tasa de homología con la de humano y se localiza en los nucléolos.
5. La sobreexpresión de *dkc1* en *D. discoideum* disminuye el crecimiento, disminuye los niveles de expresión de *gar1*, *nhp2* y *nop10* y aumenta la señal de daño al ADN tanto en situación basal como con el agente citotóxico bleomicina.
6. Se han sobreexpresado en *D. dicoideum* cuatro mutaciones de la proteína Dkc1 idénticas a las que presentan pacientes humanos con disqueratosis congénita. Los efectos producidos son similares a los observados al expresar Dkc1 no mutada con la excepción de la mutación 2 (Thr33Met) que disminuye los niveles de pseudouridilación del ARNr 26s y del snoRNA18 y de la mutación 3 (Ser105Gly) que produce menor señal del daño al ADN.
7. Se han generado dos cepas en *D. discoideum* en las que el gen *dkc1* presenta dos mutaciones patológicas humanas. La mutación 2 (Thr33Met) de Dkc1 disminuye los niveles de expresión de *gar1*, *nhp2* y *nop10*. Las mutaciones 1 (Ile38Thr) y 2 (Thr33Met) elevan la respuesta al daño en el ADN en presencia de bleomicina.
8. El aumento de señalización del daño al ADN es una consecuencia común de la sobreexpresión de Dkc1, con o sin mutaciones, y de la mutación del gen endógeno y podría reflejar una actividad de Dkc1 independiente de las funciones en extensión telomérica y pseudouridilación del ARN.

BIBLIOGRAFÍA

1. Raff, R.A., *The shape of life : genes, development, and the evolution of animal form*. 1996, Chicago: University of Chicago Press. 1 online resource (545 pages).
2. Eichinger, L., et al., *The genome of the social amoeba Dictyostelium discoideum*. *Nature*, 2005. **435**: p. 43-57.
3. Grainger, R.M. and N. Maizels, *Dictyostelium ribosomal RNA is processed during transcription*. *Cell*, 1980. **20**: p. 619-623.
4. Orr, H.T. and H.Y. Zoghbi, *Trinucleotide repeat disorders*. *Annu Rev Neurosci*, 2007. **30**: p. 575-621.
5. Sugang, R., et al., *Comparative genomics of the social amoebae Dictyostelium discoideum and Dictyostelium purpureum*. *Genome Biol*, 2011. **12**(2): p. R20.
6. Hagele, S., et al., *Dictyostelium discoideum: a new host model system for intracellular pathogens of the genus Legionella*. *Cell. Microbiol.*, 2000. **2**: p. 165-171.
7. Cardelli, J., *Phagocytosis and macropinocytosis in Dictyostelium: phosphoinositide-based processes, biochemically distinct*. *Traffic*, 2001. **2**: p. 311-320.
8. Ashworth, J.M. and D.J. Watts, *Metabolism of the cellular slime mould Dictyostelium discoideum grown in axenic culture*. *Biochem. J.*, 1970. **119**: p. 175-182.
9. Loomis, W.F., *Genetic control of morphogenesis in Dictyostelium*. *Dev Biol*, 2015. **402**(2): p. 146-61.
10. Loomis, W.F., *Cell signaling during development of Dictyostelium*. *Dev Biol*, 2014. **391**(1): p. 1-16.
11. Clarke, M., J. Yang, and S. Kayman, *Analysis of the prestarvation response in growing cells of Dictyostelium discoideum*. *Dev. Genet.*, 1988. **9**: p. 315-326.
12. Clarke, M. and R.H. Gomer, *PSF and CMF, autocrine factors that regulate gene expression during growth and early development of Dictyostelium*. *Experientia*, 1995. **51**: p. 1124-1134.
13. Yuen, I.S., et al., *A density-sensing factor regulates signal transduction in Dictyostelium*. *J. Cell Biol.*, 1995. **129**: p. 1251-1262.
14. van Haastert, P.J.M., J.D. Bishop, and R.H. Gomer, *The cell density factor CMF regulates the chemoattractant receptor cAR1 in Dictyostelium*. *J. Cell Biol.*, 1996. **134**: p. 1543-1549.
15. Gomer, R.H., W. Jang, and D. Brazill, *Cell density sensing and size determination*. *Dev Growth Differ*.
16. Rosengarten, R.D., et al., *Leaps and lulls in the developmental transcriptome of Dictyostelium discoideum*. *BMC Genomics*, 2015. **16**: p. 294.
17. Rodriguez-Centeno, J. and L. Sastre, *Biological Activity of the Alternative Promoters of the Dictyostelium discoideum Adenylyl Cyclase A Gene*. *PLoS One*, 2016. **11**(2): p. e0148533.
18. Galardi-Castilla, M., et al., *The Dictyostelium discoideum acaA gene is transcribed from alternative promoters during aggregation and multicellular development*. *PLoS One*, 2010. **5**(10): p. e13286.
19. Escalante, R. and J.J. Vicente, *Dictyostelium discoideum: a model system for differentiation and patterning*. *Int. J. Dev. Biol.*, 2000. **44**: p. 819- 835.
20. Chen, Z.H. and P. Schaap, *Secreted Cyclic Di-GMP Induces Stalk Cell Differentiation in the Eukaryote Dictyostelium discoideum*. *J Bacteriol*, 2016. **198**(1): p. 27-31.
21. Katoh, M., et al., *Developmental commitment in Dictyostelium discoideum*. *Eukaryot Cell*, 2007. **6**(11): p. 2038-45.
22. Raper, K.B., *Pseudoplasmodium formation and organization in Dictyostelium discoideum*. *J. Elisha Mitchell Sci. Soc.*, 1940. **56**: p. 241-282.
23. Williams, J.G., *Transcriptional regulation of Dictyostelium pattern formation*. *EMBO Rep.*, 2006. **7**(7): p. 694-698.

24. Kay, R.R. and C.R.L. Thompson, *Cross-induction of cell types in Dictyostelium: evidence that DIF-1 is made by prespore cells*. Development, 2001. **128**: p. 4959-4966.
25. West, C.M., *Comparative analysis of spore coat formation, structure, and function in Dictyostelium*. Int. Rev. Cytol., 2003. **222**: p. 237-293.
26. Palm, W. and T. de Lange, *How shelterin protects mammalian telomeres*. Annu Rev Genet, 2008. **42**: p. 301-34.
27. Wellinger, R.J., A.J. Wolf, and V.A. Zakian, *Saccharomyces telomeres acquire single-strand TG1-3 tails late in S phase*. Cell, 1993. **72**(1): p. 51-60.
28. Griffith, J.D., et al., *Mammalian telomeres end in a large duplex loop*. Cell, 1999. **97**(4): p. 503-14.
29. Fajkus, P., et al., *Allium telomeres unmasked: the unusual telomeric sequence (CTCGGTTATGGG)_n is synthesized by telomerase*. Plant J, 2016. **85**(3): p. 337-47.
30. Casacuberta, E. and M.L. Pardue, *HeT-A and TART, two Drosophila retrotransposons with a bona fide role in chromosome structure for more than 60 million years*. Cytogenet Genome Res, 2005. **110**(1-4): p. 152-9.
31. Emery, H.S. and A.M. Weiner, *An irregular satellite sequence is found at the termini of the linear extrachromosomal rDNA in Dictyostelium discoideum*. Cell, 1981. **26**(3 Pt 1): p. 411-9.
32. de Lange, T., *Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres*. Genes Dev, 2005. **19**(18): p. 2100-10.
33. Harley, C.B., A.B. Futcher, and C.W. Greider, *Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts*. Nature, 1990. **345**(6274): p. 458-60.
34. Else, T., *Telomeres and telomerase in adrenocortical tissue maintenance, carcinogenesis, and aging*. J Mol Endocrinol, 2009. **43**(4): p. 131-41.
35. Karlseder, J., et al., *p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2*. Science, 1999. **283**(5406): p. 1321-5.
36. Greider, C.W. and E.H. Blackburn, *Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts*. Cell, 1985. **43**(2 Pt 1): p. 405-13.
37. Blackburn, E.H., C.W. Greider, and J.W. Szostak, *Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging*. Nat Med, 2006. **12**(10): p. 1133-8.
38. Armanios, M. and E.H. Blackburn, *The telomere syndromes*. Nat Rev Genet, 2012. **13**(10): p. 693-704.
39. Chen, J.L. and C.W. Greider, *Template boundary definition in mammalian telomerase*. Genes Dev, 2003. **17**(22): p. 2747-52.
40. Tzfati, Y., et al., *Template boundary in a yeast telomerase specified by RNA structure*. Science, 2000. **288**(5467): p. 863-7.
41. Mitchell, J.R. and K. Collins, *Human telomerase activation requires two independent interactions between telomerase RNA and telomerase reverse transcriptase*. Mol Cell, 2000. **6**(2): p. 361-71.
42. Mitchell, J.R., E. Wood, and K. Collins, *A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita*. Nature, 1999. **402**(6761): p. 551-5.
43. Perona, R., et al., *Molecular Diagnosis and Precision Therapeutic Approaches for Telomere Biology Disorders*, in *Telomere-A Complex End of a Chromosome*, M. Larramendy, Editor. 2016, InTech.
44. Venteicher, A.S., et al., *A human telomerase holoenzyme protein required for Cajal body localization and telomere synthesis*. Science, 2009. **323**(5914): p. 644-8.
45. Nakamura, T.M., et al., *Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human*. Science, 1997. **277**(5328): p. 955-9.
46. Lingner, J., et al., *Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase*. Science, 1997. **276**(5312): p. 561-7.

47. Heidel, A.J., et al., *Phylogeny-wide analysis of social amoeba genomes highlights ancient origins for complex intercellular communication*. Genome Res, 2011. **21**(11): p. 1882-91.
48. Greider, C.W., *Molecular biology. Wnt regulates TERT--putting the horse before the cart*. Science, 2012. **336**(6088): p. 1519-20.
49. Horikawa, I., et al., *Differential cis-regulation of human versus mouse TERT gene expression in vivo: identification of a human-specific repressive element*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(51): p. 18437-42.
50. Fajkus, J., et al., *Plant cells express telomerase activity upon transfer to callus culture, without extensively changing telomere lengths*. Mol Gen Genet, 1998. **260**(5): p. 470-4.
51. Collado, M., M.A. Blasco, and M. Serrano, *Cellular senescence in cancer and aging*. Cell, 2007. **130**(2): p. 223-33.
52. Henson, J.D. and R.R. Reddel, *Assaying and investigating Alternative Lengthening of Telomeres activity in human cells and cancers*. FEBS Lett, 2010. **584**(17): p. 3800-11.
53. Blasco, M.A., et al., *Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA*. Cell, 1997. **91**(1): p. 25-34.
54. Lundblad, V. and J.W. Szostak, *A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast*. Cell, 1989. **57**(4): p. 633-43.
55. Yuan, X., et al., *Presence of telomeric G-strand tails in the telomerase catalytic subunit TERT knockout mice*. Genes Cells, 1999. **4**(10): p. 563-72.
56. Allshire, R.C., M. Dempster, and N.D. Hastie, *Human telomeres contain at least three types of G-rich repeat distributed non-randomly*. Nucleic Acids Res, 1989. **17**(12): p. 4611-27.
57. de Lange, T., et al., *Structure and variability of human chromosome ends*. Mol Cell Biol, 1990. **10**(2): p. 518-27.
58. Dunham, M.A., et al., *Telomere maintenance by recombination in human cells*. Nat Genet, 2000. **26**(4): p. 447-50.
59. Murnane, J.P., et al., *Telomere dynamics in an immortal human cell line*. EMBO J, 1994. **13**(20): p. 4953-62.
60. Jeyapalan, J.N., et al., *Activation of the ALT pathway for telomere maintenance can affect other sequences in the human genome*. Hum Mol Genet, 2005. **14**(13): p. 1785-94.
61. Tsutsui, T., et al., *Immortal, telomerase-negative cell lines derived from a Li-Fraumeni syndrome patient exhibit telomere length variability and chromosomal and minisatellite instabilities*. Carcinogenesis, 2003. **24**(5): p. 953-65.
62. Henson, J.D., et al., *Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells*. Oncogene, 2002. **21**(4): p. 598-610.
63. Yeager, T.R., et al., *Telomerase-negative immortalized human cells contain a novel type of promyelocytic leukemia (PML) body*. Cancer Res, 1999. **59**(17): p. 4175-9.
64. Johnson, F.B., et al., *The Saccharomyces cerevisiae WRN homolog Sgs1p participates in telomere maintenance in cells lacking telomerase*. EMBO J, 2001. **20**(4): p. 905-13.
65. Wu, L., et al., *Potential role for the BLM helicase in recombinational repair via a conserved interaction with RAD51*. J Biol Chem, 2001. **276**(22): p. 19375-81.
66. Yankiwski, V., et al., *Nuclear structure in normal and Bloom syndrome cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(10): p. 5214-9.
67. Zhu, X.D., et al., *Cell-cycle-regulated association of RAD50/MRE11/NBS1 with TRF2 and human telomeres*. Nat Genet, 2000. **25**(3): p. 347-52.
68. Boisvert, F.M., M.J. Hendzel, and D.P. Bazett-Jones, *Promyelocytic leukemia (PML) nuclear bodies are protein structures that do not accumulate RNA*. J Cell Biol, 2000. **148**(2): p. 283-92.
69. Chung, I., et al., *PML body meets telomere: the beginning of an ALternate ending?* Nucleus, 2012. **3**(3): p. 263-75.

70. Lallemand-Breitenbach, V., et al., *Role of promyelocytic leukemia (PML) sumolation in nuclear body formation, 11S proteasome recruitment, and As2O3-induced PML or PML/retinoic acid receptor alpha degradation*. J Exp Med, 2001. **193**(12): p. 1361-71.
71. Grobelny, J.V., A.K. Godwin, and D. Broccoli, *ALT-associated PML bodies are present in viable cells and are enriched in cells in the G(2)/M phase of the cell cycle*. J Cell Sci, 2000. **113 Pt 24**: p. 4577-85.
72. Nabetani, A., O. Yokoyama, and F. Ishikawa, *Localization of hRad9, hHus1, hRad1, and hRad17 and caffeine-sensitive DNA replication at the alternative lengthening of telomeres-associated promyelocytic leukemia body*. J Biol Chem, 2004. **279**(24): p. 25849-57.
73. Cesare, A.J., et al., *Spontaneous occurrence of telomeric DNA damage response in the absence of chromosome fusions*. Nat Struct Mol Biol, 2009. **16**(12): p. 1244-51.
74. Draskovic, I., et al., *Probing PML body function in ALT cells reveals spatiotemporal requirements for telomere recombination*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(37): p. 15726-31.
75. Fasching, C.L., et al., *DNA damage induces alternative lengthening of telomeres (ALT) associated promyelocytic leukemia bodies that preferentially associate with linear telomeric DNA*. Cancer Res, 2007. **67**(15): p. 7072-7.
76. Tokutake, Y., et al., *Extra-chromosomal telomere repeat DNA in telomerase-negative immortalized cell lines*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **247**(3): p. 765-72.
77. Ogino, H., et al., *Release of telomeric DNA from chromosomes in immortal human cells lacking telomerase activity*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **248**(2): p. 223-7.
78. Cesare, A.J. and J.D. Griffith, *Telomeric DNA in ALT cells is characterized by free telomeric circles and heterogeneous t-loops*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(22): p. 9948-57.
79. Lin, C.Y., et al., *Extrachromosomal telomeric circles contribute to Rad52-, Rad50-, and polymerase delta-mediated telomere-telomere recombination in Saccharomyces cerevisiae*. Eukaryot Cell, 2005. **4**(2): p. 327-36.
80. Natarajan, S., C. Groff-Vindman, and M.J. McEachern, *Factors influencing the recombinational expansion and spread of telomeric tandem arrays in Kluyveromyces lactis*. Eukaryot Cell, 2003. **2**(5): p. 1115-27.
81. Natarajan, S. and M.J. McEachern, *Recombinational telomere elongation promoted by DNA circles*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(13): p. 4512-21.
82. Szostak, J.W. and E.H. Blackburn, *Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors*. Cell, 1982. **29**(1): p. 245-55.
83. Niida, H., et al., *Telomere maintenance in telomerase-deficient mouse embryonic stem cells: characterization of an amplified telomeric DNA*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(11): p. 4115-27.
84. Fasching, C.L., K. Bower, and R.R. Reddel, *Telomerase-independent telomere length maintenance in the absence of alternative lengthening of telomeres-associated promyelocytic leukemia bodies*. Cancer Res, 2005. **65**(7): p. 2722-9.
85. Marciniak, R.A., et al., *A novel telomere structure in a human alternative lengthening of telomeres cell line*. Cancer Res, 2005. **65**(7): p. 2730-7.
86. Jiang, W.Q., et al., *Suppression of alternative lengthening of telomeres by Sp100-mediated sequestration of the MRE11/RAD50/NBS1 complex*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(7): p. 2708-21.
87. Potts, P.R. and H. Yu, *The SMC5/6 complex maintains telomere length in ALT cancer cells through SUMOylation of telomere-binding proteins*. Nat Struct Mol Biol, 2007. **14**(7): p. 581-90.
88. Zhong, Z.H., et al., *Disruption of telomere maintenance by depletion of the MRE11/RAD50/NBS1 complex in cells that use alternative lengthening of telomeres*. J Biol Chem, 2007. **282**(40): p. 29314-22.

89. Jiang, W.Q., et al., *Identification of candidate alternative lengthening of telomeres genes by methionine restriction and RNA interference*. *Oncogene*, 2007. **26**(32): p. 4635-47.
90. van Steensel, B., A. Smogorzewska, and T. de Lange, *TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions*. *Cell*, 1998. **92**(3): p. 401-13.
91. Bhattacharyya, S., et al., *Telomerase-associated protein 1, HSP90, and topoisomerase IIalpha associate directly with the BLM helicase in immortalized cells using ALT and modulate its helicase activity using telomeric DNA substrates*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(22): p. 14966-77.
92. Temime-Smaali, N., et al., *Topoisomerase IIalpha is required for normal proliferation and telomere stability in alternative lengthening of telomeres*. *EMBO J*, 2008. **27**(10): p. 1513-24.
93. Zeng, S., et al., *Telomere recombination requires the MUS81 endonuclease*. *Nat Cell Biol*, 2009. **11**(5): p. 616-23.
94. Compton, S.A., et al., *Xrcc3 and Nbs1 are required for the production of extrachromosomal telomeric circles in human alternative lengthening of telomere cells*. *Cancer Res*, 2007. **67**(4): p. 1513-9.
95. Saharia, A. and S.A. Stewart, *FEN1 contributes to telomere stability in ALT-positive tumor cells*. *Oncogene*, 2009. **28**(8): p. 1162-7.
96. Grudic, A., et al., *Replication protein A prevents accumulation of single-stranded telomeric DNA in cells that use alternative lengthening of telomeres*. *Nucleic Acids Res*, 2007. **35**(21): p. 7267-78.
97. Cohen, S.B., et al., *Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells*. *Science*, 2007. **315**(5820): p. 1850-3.
98. Jiang, W., et al., *An essential yeast protein, CBF5p, binds in vitro to centromeres and microtubules*. *Mol Cell Biol*, 1993. **13**(8): p. 4884-93.
99. Meier, U.T. and G. Blobel, *NAP57, a mammalian nucleolar protein with a putative homolog in yeast and bacteria*. *J Cell Biol*, 1994. **127**(6 Pt 1): p. 1505-14.
100. Normand, C., et al., *Analysis of the binding of the N-terminal conserved domain of yeast Cbf5p to a box H/ACA snoRNA*. *RNA*, 2006. **12**(10): p. 1868-82.
101. Wang, C. and U.T. Meier, *Architecture and assembly of mammalian H/ACA small nucleolar and telomerase ribonucleoproteins*. *EMBO J*, 2004. **23**(8): p. 1857-67.
102. Fu, D. and K. Collins, *Distinct biogenesis pathways for human telomerase RNA and H/ACA small nucleolar RNAs*. *Mol Cell*, 2003. **11**(5): p. 1361-72.
103. Savage, S.A. and B.P. Alter, *Dyskeratosis congenita*. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2009. **23**(2): p. 215-31.
104. Heiss, N.S., et al., *X-linked dyskeratosis congenita is caused by mutations in a highly conserved gene with putative nucleolar functions*. *Nat Genet*, 1998. **19**(1): p. 32-8.
105. Wong, J.M. and K. Collins, *Telomerase RNA level limits telomere maintenance in X-linked dyskeratosis congenita*. *Genes Dev*, 2006. **20**(20): p. 2848-58.
106. Cohn, W.E. and W. Volkin, *Nucleoside-5'-Phosphates from Ribonucleic Acid*. *Nature*, 1951. **167**: p. 483-484.
107. Ge, J. and Y.T. Yu, *RNA pseudouridylation: new insights into an old modification*. *Trends Biochem Sci*, 2013. **38**(4): p. 210-8.
108. Nishimura, S., *[Modified nucleosides in tRNA: its structure, biosynthesis and function (author's transl)]*. Tanpakushitsu Kakusan Koso, 1977. **22 Spec No**(7): p. 922-30.
109. Ofengand, J.a.F., M., *The pseudouridine residues of rRNA: number, location, biosynthesis, and function.*, in *Modification and editing of RNA*, H.a.B. Grosjean, R., eds, Editor. 1998, ASM press. p. 229-253.
110. Reddy, R.a.B., H., *Small nuclear RNAs: RNA sequences, structure, and modifications*, in *Structure and Function of Major and Minor Small Nuclear Ribonucleoprotein Particles*, M.L. Birnstiel, Editor. 1988, Springer-Verlag. p. 1-37.

111. Schattner, P., S. Barberan-Soler, and T.M. Lowe, *A computational screen for mammalian pseudouridylation guide H/ACA RNAs*. RNA, 2006. **12**(1): p. 15-25.
112. Dominissini, D., et al., *The dynamic N(1)-methyladenosine methylome in eukaryotic messenger RNA*. Nature, 2016. **530**(7591): p. 441-6.
113. Li, X., et al., *Chemical pulldown reveals dynamic pseudouridylation of the mammalian transcriptome*. Nat Chem Biol, 2015. **11**(8): p. 592-7.
114. Schwartz, S., et al., *Transcriptome-wide mapping reveals widespread dynamic-regulated pseudouridylation of ncRNA and mRNA*. Cell, 2014. **159**(1): p. 148-62.
115. Ofengand, J., *Ribosomal RNA pseudouridines and pseudouridine synthases*. FEBS Lett, 2002. **514**(1): p. 17-25.
116. Machnicka, M.A., et al., *MODOMICS: a database of RNA modification pathways--2013 update*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(Database issue): p. D262-7.
117. Carlile, T.M., et al., *Pseudouridine profiling reveals regulated mRNA pseudouridylation in yeast and human cells*. Nature, 2014. **515**(7525): p. 143-6.
118. Lovejoy, A.F., D.P. Riordan, and P.O. Brown, *Transcriptome-wide mapping of pseudouridines: pseudouridine synthases modify specific mRNAs in S. cerevisiae*. PLoS One, 2014. **9**(10): p. e110799.
119. Decatur, W.A. and M.J. Fournier, *rRNA modifications and ribosome function*. Trends Biochem Sci, 2002. **27**(7): p. 344-51.
120. Baudin-Baillieu, A., et al., *Nucleotide modifications in three functionally important regions of the Saccharomyces cerevisiae ribosome affect translation accuracy*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(22): p. 7665-77.
121. Davis, D.R., *Stabilization of RNA stacking by pseudouridine*. Nucleic Acids Res, 1995. **23**(24): p. 5020-6.
122. Newby, M.I. and N.L. Greenbaum, *A conserved pseudouridine modification in eukaryotic U2 snRNA induces a change in branch-site architecture*. RNA, 2001. **7**(6): p. 833-45.
123. Arnez, J.G. and T.A. Steitz, *Crystal structure of unmodified tRNA(Gln) complexed with glutaminyl-tRNA synthetase and ATP suggests a possible role for pseudo-uridines in stabilization of RNA structure*. Biochemistry, 1994. **33**(24): p. 7560-7.
124. Lee, S.H., I. Kim, and B.C. Chung, *Increased urinary level of oxidized nucleosides in patients with mild-to-moderate Alzheimer's disease*. Clin Biochem, 2007. **40**(13-14): p. 936-8.
125. Zhou, B.B. and S.J. Elledge, *The DNA damage response: putting checkpoints in perspective*. Nature, 2000. **408**(6811): p. 433-9.
126. Downs, J.A. and S.P. Jackson, *Cancer: protective packaging for DNA*. Nature, 2003. **424**(6950): p. 732-4.
127. Sussman, M., *Cultivation and synchronous morphogenesis of Dictyostelium under controlled experimental conditions.*, in *Methods in Cell Biology*, J.A. Spudich, Editor. 1987, Ac. Press: Orlando, FL. p. 9-29.
128. Meima, M.E., K.E. Weening, and P. Schaap, *Vectors for expression of proteins with single or combinatorial fluorescent protein and tandem affinity purification tags in Dictyostelium*. Protein Expr Purif, 2007. **53**(2): p. 283-8.
129. Dubin, M. and W. Nellen, *A versatile set of tagged expression vectors to monitor protein localisation and function in Dictyostelium*. Gene, 2010. **465**(1-2): p. 1-8.
130. Veltman, D.M., et al., *A new set of small, extrachromosomal expression vectors for Dictyostelium discoideum*. Plasmid, 2009. **61**(2): p. 110-8.
131. Faix, J., et al., *A rapid and efficient method to generate multiple gene disruptions in Dictyostelium discoideum using a single selectable marker and the Cre-loxP system*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(19): p. e143.
132. Pang, K.M., M.A. Lynes, and D.A. Knecht, *Variables controlling the expression level of exogenous genes in Dictyostelium*. Plasmid, 1999. **41**: p. 187-197.

133. Shaulsky, G. and W.F. Loomis, *Cell type regulation in response to expression of ricin-A in Dictyostelium*. Dev. Biol., 1993. **160**: p. 85-98.
134. Galardi-Castilla, M., et al., *Mef2A, a homologue of animal Mef2 transcription factors, regulates cell differentiation in Dictyostelium discoideum*. BMC Dev Biol, 2013. **13**: p. 12.
135. Giulietti, A., et al., *An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression*. Methods, 2001. **25**(4): p. 386-401.
136. Bakin, A. and J. Ofengand, *Four newly located pseudouridylate residues in Escherichia coli 23S ribosomal RNA are all at the peptidyltransferase center: analysis by the application of a new sequencing technique*. Biochemistry, 1993. **32**(37): p. 9754-62.
137. Loomis, W.F., et al., *Integrated maps of the chromosomes in Dictyostelium discoideum*. Genetics, 1995. **141**: p. 147-157.
138. Cockburn, A.F., W.C. Taylor, and R.A. Firtel, *Dictyostelium rDNA consists of nonchromosomal palindromic dimers containing 5S and 36S coding regions*. Chromosoma, 1978. **70**: p. 19-29.
139. Cesare, A.J. and R.R. Reddel, *Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications*. Nat Rev Genet. **11**(5): p. 319-30.
140. Pastink, A., J.C. Eeken, and P.H. Lohman, *Genomic integrity and the repair of double-strand DNA breaks*. Mutat Res, 2001. **480-481**: p. 37-50.
141. Swuec, P. and A. Costa, *Molecular mechanism of double Holliday junction dissolution*. Cell Biosci, 2014. **4**: p. 36.
142. Kuspa, A., et al., *Physical mapping of genes to specific chromosomes in Dictyostelium discoideum*. Genomics, 1992. **13**: p. 49-61.
143. Chavez, A., et al., *Sumoylation and the structural maintenance of chromosomes (Smc) 5/6 complex slow senescence through recombination intermediate resolution*. J Biol Chem, 2010. **285**(16): p. 11922-30.
144. Noel, J.F. and R.J. Wellinger, *Abrupt telomere losses and reduced end-resection can explain accelerated senescence of Smc5/6 mutants lacking telomerase*. DNA Repair (Amst), 2011. **10**(3): p. 271-82.
145. Wan, Y., et al., *The functional role of SUMO E3 ligase Mms21p in the maintenance of subtelomeric silencing in budding yeast*. Biochem Biophys Res Commun, 2013. **438**(4): p. 746-52.
146. Lindroos, H.B., et al., *Chromosomal association of the Smc5/6 complex reveals that it functions in differently regulated pathways*. Mol Cell, 2006. **22**(6): p. 755-67.
147. Murray, J.M. and A.M. Carr, *Smc5/6: a link between DNA repair and unidirectional replication?* Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(2): p. 177-82.
148. Torres-Rosell, J., et al., *SMC5 and SMC6 genes are required for the segregation of repetitive chromosome regions*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(4): p. 412-9.
149. Chubb, J.R., et al., *Developmental timing in Dictyostelium is regulated by the Set1 histone methyltransferase*. Dev Biol, 2006. **292**(2): p. 519-32.
150. Moore, H.M., et al., *Quantitative proteomics and dynamic imaging of the nucleolus reveal distinct responses to UV and ionizing radiation*. Mol Cell Proteomics, 2011. **10**(10): p. M111 009241.
151. Cadwell, C., et al., *The yeast nucleolar protein Cbf5p is involved in rRNA biosynthesis and interacts genetically with the RNA polymerase I transcription factor RRN3*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(10): p. 6175-83.
152. Rashid, R., et al., *Crystal structure of a Cbf5-Nop10-Gar1 complex and implications in RNA-guided pseudouridylation and dyskeratosis congenita*. Mol Cell, 2006. **21**(2): p. 249-60.
153. Hama, T., et al., *The Cbf5-Nop10 complex is a molecular bracket that organizes box H/ACA RNPs*. Nat Struct Mol Biol, 2005. **12**(12): p. 1101-7.

154. Manival, X., et al., *Crystal structure determination and site-directed mutagenesis of the Pyrococcus abyssi aCBF5-aNOP10 complex reveal crucial roles of the C-terminal domains of both proteins in H/ACA sRNP activity*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(3): p. 826-39.
155. Hoang, C. and A.R. Ferre-D'Amare, *Cocrystal structure of a tRNA^{Psi55} pseudouridine synthase: nucleotide flipping by an RNA-modifying enzyme*. Cell, 2001. **107**(7): p. 929-39.
156. Carrillo, J., et al., *p53 pathway activation by telomere attrition in X-DC primary fibroblasts occurs in the absence of ribosome biogenesis failure and as a consequence of DNA damage*. Clin Transl Oncol, 2013. **16**(6): p. 529-38.
157. Bellodi, C., N. Kopmar, and D. Ruggero, *Deregulation of oncogene-induced senescence and p53 translational control in X-linked dyskeratosis congenita*. EMBO J, 2010. **29**(11): p. 1865-76.
158. Bellodi, C., et al., *Loss of function of the tumor suppressor DKC1 perturbs p27 translation control and contributes to pituitary tumorigenesis*. Cancer Res, 2010. **70**(14): p. 6026-35.
159. Montanaro, L., et al., *Novel dyskerin-mediated mechanism of p53 inactivation through defective mRNA translation*. Cancer Res, 2010. **70**(11): p. 4767-77.
160. Scott, M.S., et al., *Human miRNA precursors with box H/ACA snoRNA features*. PLoS Comput Biol, 2009. **5**(9): p. e1000507.
161. Alawi, F. and P. Lin, *Loss of dyskerin reduces the accumulation of a subset of H/ACA snoRNA-derived miRNA*. Cell Cycle, 2010. **9**(12): p. 2467-9.
162. Kiss, T., et al., *Biogenesis and intranuclear trafficking of human box C/D and H/ACA RNPs*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2006. **71**: p. 407-17.
163. Gilham, P.T., *An Addition Reaction Specific for Uridine and Guanosine Nucleotides and its Application to the Modification of Ribonuclease Action*. Journal of the American Chemical Society 1962. **84**(4): p. 687-688.
164. Reichow, S.L., et al., *The structure and function of small nucleolar ribonucleoproteins*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(5): p. 1452-64.
165. Grozdanov, P.N. and U.T. Meier, *Multicomponent machines in RNA modification: H/ACA ribonucleoproteins*, in *DNA and RNA Modification Enzymes: Structure, Mechanism, Function and Evolution*, H. Grosjean, Editor. 2009, Landes Bioscience: Austin, TX. p. 450-60.
166. Meier, U.T., *The many facets of H/ACA ribonucleoproteins*. Chromosoma, 2005. **114**(1): p. 1-14.
167. Watkins, N.J. and M.T. Bohnsack, *The box C/D and H/ACA snoRNPs: key players in the modification, processing and the dynamic folding of ribosomal RNA*. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2012. **3**(3): p. 397-414.
168. Kiss, T., E. Fayet-Lebaron, and B.E. Jady, *Box H/ACA small ribonucleoproteins*. Mol Cell, 2010. **37**(5): p. 597-606.
169. Ye, K., *H/ACA guide RNAs, proteins and complexes*. Curr Opin Struct Biol, 2007. **17**(3): p. 287-92.
170. Liang, B. and H. Li, *Structures of ribonucleoprotein particle modification enzymes*. Q Rev Biophys, 2011. **44**(1): p. 95-122.
171. Gu, B.W., M. Bessler, and P.J. Mason, *A pathogenic dyskerin mutation impairs proliferation and activates a DNA damage response independent of telomere length in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(29): p. 10173-8.
172. Pereboeva, L., et al., *DNA damage responses and oxidative stress in dyskeratosis congenita*. PLoS One. **8**(10): p. e76473.
173. Kirwan, M., et al., *Dyskeratosis congenita and the DNA damage response*. Br J Haematol. **153**(5): p. 634-43.

174. Rogakou, E.P., et al., *DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139*. J Biol Chem, 1998. **273**(10): p. 5858-68.
175. Linger, B.R. and C.M. Price, *Conservation of telomere protein complexes: shuffling through evolution*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2009. **44**(6): p. 434-46.
176. Karamysheva, Z.N., et al., *A C-terminal Myb extension domain defines a novel family of double-strand telomeric DNA-binding proteins in Arabidopsis*. J Biol Chem, 2004. **279**(46): p. 47799-807.
177. Li, B., A. Espinal, and G.A. Cross, *Trypanosome telomeres are protected by a homologue of mammalian TRF2*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(12): p. 5011-21.
178. Bilaud, T., et al., *Telomeric localization of TRF2, a novel human telobox protein*. Nat Genet, 1997. **17**(2): p. 236-9.
179. Broccoli, D., et al., *Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2*. Nat Genet, 1997. **17**(2): p. 231-5.
180. Biessmann, H. and J.M. Mason, *Telomere maintenance without telomerase*. Chromosoma, 1997. **106**(2): p. 63-9.
181. Marrone, A., et al., *Telomerase reverse-transcriptase homozygous mutations in autosomal recessive dyskeratosis congenita and Hoyeraal-Hreidarsson syndrome*. Blood, 2007. **110**(13): p. 4198-205.
182. Chambers, D.C., et al., *Lung fibrosis, premature graying, and macrocytosis*. Am J Respir Crit Care Med, 2012. **186**(5): p. e8-9.
183. Liang, J., et al., *Mutations in telomerase catalytic protein in Japanese children with aplastic anemia*. Haematologica, 2006. **91**(5): p. 656-8.
184. Du, H.Y., et al., *TERC and TERT gene mutations in patients with bone marrow failure and the significance of telomere length measurements*. Blood, 2009. **113**(2): p. 309-16.
185. Vulliamy, T.J., et al., *Differences in disease severity but similar telomere lengths in genetic subgroups of patients with telomerase and shelterin mutations*. PLoS One. **6**(9): p. e24383.
186. Saretzki, G., *Extra-telomeric functions of human telomerase: cancer, mitochondria and oxidative stress*. Curr Pharm Des, 2014. **20**(41): p. 6386-403.
187. Sung, Y.H., M. Ali, and H.W. Lee, *Extracting extra-telomeric phenotypes from telomerase mouse models*. Yonsei Med J, 2014. **55**(1): p. 1-8.
188. Biessmann, H., et al., *Addition of telomere-associated HeT DNA sequences "heals" broken chromosome ends in Drosophila*. Cell, 1990. **61**(4): p. 663-73.
189. Boeke, J.D., et al., *Ty elements transpose through an RNA intermediate*. Cell, 1985. **40**(3): p. 491-500.
190. Kim, J.M., et al., *Transposable elements and genome organization: a comprehensive survey of retrotransposons revealed by the complete Saccharomyces cerevisiae genome sequence*. Genome Res, 1998. **8**(5): p. 464-78.
191. Lander, E.S., et al., *Initial sequencing and analysis of the human genome*. Nature, 2001. **409**(6822): p. 860-921.
192. Mouse Genome Sequencing, C., et al., *Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome*. Nature, 2002. **420**(6915): p. 520-62.
193. Adams, M.D., et al., *The genome sequence of Drosophila melanogaster*. Science, 2000. **287**(5461): p. 2185-95.
194. Glockner, G., et al., *The complex repeats of Dictyostelium discoideum*. Genome Res., 2001. **11**: p. 585-594.
195. Nabetani, A. and F. Ishikawa, *Alternative lengthening of telomeres pathway: recombination-mediated telomere maintenance mechanism in human cells*. J Biochem, 2010. **149**(1): p. 5-14.
196. Kim, J., et al., *Tudor, MBT and chromo domains gauge the degree of lysine methylation*. EMBO Rep, 2006. **7**(4): p. 397-403.

197. D'Amours, D. and S.P. Jackson, *The Mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signalling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(5): p. 317-27.
198. van den Bosch, M., R.T. Bree, and N.F. Lowndes, *The MRN complex: coordinating and mediating the response to broken chromosomes*. EMBO Rep, 2003. **4**(9): p. 844-9.
199. Avaritt, N.L., et al., *Misregulation of Rad50 expression in melanoma cells*. J Cutan Pathol, 2012. **39**(7): p. 680-4.
200. Shin, B.A., et al., *Overexpressed human RAD50 exhibits cell death in a p21(WAF1/CIP1)-dependent manner: its potential utility in local gene therapy of tumor*. Cell Growth Differ, 2001. **12**(5): p. 243-54.
201. Kanaar, R. and C. Wyman, *DNA repair by the MRN complex: break it to make it*. Cell, 2008. **135**(1): p. 14-6.
202. Costanzo, V., *Brca2, Rad51 and Mre11: performing balancing acts on replication forks*. DNA Repair (Amst), 2011. **10**(10): p. 1060-5.
203. Gildemeister, O.S., J.M. Sage, and K.L. Knight, *Cellular redistribution of Rad51 in response to DNA damage: novel role for Rad51C*. J Biol Chem, 2009. **284**(46): p. 31945-52.
204. Henson, S.E., et al., *Pir51, a Rad51-interacting protein with high expression in aggressive lymphoma, controls mitomycin C sensitivity and prevents chromosomal breaks*. Mutat Res, 2006. **601**(1-2): p. 113-24.
205. Mladenov, E., B. Anachkova, and I. Tsaneva, *Sub-nuclear localization of Rad51 in response to DNA damage*. Genes Cells, 2006. **11**(5): p. 513-24.
206. De Potter, C.R., E.D. Coene, and V.R. Schelfhout, *Localization of BRCA1 protein at the cellular level*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 1998. **3**(4): p. 423-9.
207. Richardson, C., et al., *Rad51 overexpression promotes alternative double-strand break repair pathways and genome instability*. Oncogene, 2004. **23**(2): p. 546-53.
208. Schild, D. and C. Wiese, *Overexpression of RAD51 suppresses recombination defects: a possible mechanism to reverse genomic instability*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(4): p. 1061-70.
209. Roy, M.A., T. Dhanaraman, and D. D'Amours, *The Smc5-Smc6 heterodimer associates with DNA through several independent binding domains*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 9797.
210. Dehe, P.M. and V. Geli, *The multiple faces of Set1*. Biochem Cell Biol, 2006. **84**(4): p. 536-48.
211. Martin, G.M., et al., *Set5 and Set1 cooperate to repress gene expression at telomeres and retrotransposons*. Epigenetics, 2014. **9**(4): p. 513-22.
212. Boisvert, F.M., et al., *The multifunctional nucleolus*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(7): p. 574-85.
213. Richard, P., et al., *A common sequence motif determines the Cajal body-specific localization of box H/ACA scaRNAs*. EMBO J, 2003. **22**(16): p. 4283-93.
214. Poncet, D., et al., *Changes in the expression of telomere maintenance genes suggest global telomere dysfunction in B-chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2008. **111**(4): p. 2388-91.
215. Machado-Pinilla, R., et al., *Defects in mTR stability and telomerase activity produced by the Dkc1 A353V mutation in dyskeratosis congenita are rescued by a peptide from the dyskerin TruB domain*. Clin Transl Oncol, 2012. **14**(10): p. 755-63.
216. Mochizuki, Y., et al., *Mouse dyskerin mutations affect accumulation of telomerase RNA and small nucleolar RNA, telomerase activity, and ribosomal RNA processing*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(29): p. 10756-61.
217. Jubin, T., et al., *Poly (ADP-ribose) polymerase1 regulates growth and multicellularity in D. discoideum*. Differentiation, 2016. **92**(1-2): p. 10-23.
218. Swer, P.B., et al., *Overexpression of TOR (target of rapamycin) inhibits cell proliferation in Dictyostelium discoideum*. J Basic Microbiol, 2016. **56**(5): p. 510-9.

219. Manguan-Garcia, C., et al., *Expression of the genetic suppressor element 24.2 (GSE24.2) decreases DNA damage and oxidative stress in X-linked dyskeratosis congenita cells*. PLoS One. **9**(7): p. e101424.
220. Liu, B., et al., *Dyskerin overexpression in human hepatocellular carcinoma is associated with advanced clinical stage and poor patient prognosis*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e43147.
221. Witkowska, A., et al., *Expression profile of significant immortalization genes in colon cancer*. Int J Mol Med, 2010. **25**(3): p. 321-9.
222. Sieron, P., et al., *DKC1 overexpression associated with prostate cancer progression*. Br J Cancer, 2009. **101**(8): p. 1410-6.
223. Turano, M., et al., *Real-time PCR quantification of human DKC1 expression in colorectal cancer*. Acta Oncol, 2008. **47**(8): p. 1598-9.
224. Alawi, F. and M.N. Lee, *DKC1 is a direct and conserved transcriptional target of c-MYC*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **362**(4): p. 893-8.
225. Alawi, F., et al., *Correlation of dyskerin expression with active proliferation independent of telomerase*. Head Neck, 2011. **33**(7): p. 1041-51.
226. Knight, S.W., et al., *Unexplained aplastic anaemia, immunodeficiency, and cerebellar hypoplasia (Hoyeraal-Hreidarsson syndrome) due to mutations in the dyskeratosis congenita gene, DKC1*. Br J Haematol, 1999. **107**(2): p. 335-9.
227. Wong, J.M., et al., *Telomerase RNA deficiency in peripheral blood mononuclear cells in X-linked dyskeratosis congenita*. Hum Genet, 2004. **115**(5): p. 448-55.
228. Walne, A.J., et al., *Genetic heterogeneity in autosomal recessive dyskeratosis congenita with one subtype due to mutations in the telomerase-associated protein NOP10*. Hum Mol Genet, 2007. **16**(13): p. 1619-29.
229. Henras, A.K., et al., *Cbf5p, the putative pseudouridine synthase of H/ACA-type snoRNPs, can form a complex with Gar1p and Nop10p in absence of Nhp2p and box H/ACA snoRNAs*. RNA, 2004. **10**(11): p. 1704-12.
230. Iariccio, L., et al., *GSE4, a Small Dyskerin- and GSE24.2-Related Peptide, Induces Telomerase Activity, Cell Proliferation and Reduces DNA Damage, Oxidative Stress and Cell Senescence in Dyskerin Mutant Cells*. PLoS One, 2015. **10**(11): p. e0142980.
231. Gu, B.W., et al., *Slow growth and unstable ribosomal RNA lacking pseudouridine in mouse embryonic fibroblast cells expressing catalytically inactive dyskerin*. FEBS Lett. **587**(14): p. 2112-7.
232. Marrone, A. and I. Dokal, *Dyskeratosis congenita: molecular insights into telomerase function, ageing and cancer*. Expert Rev Mol Med, 2004. **6**(26): p. 1-23.
233. Bessler, M., D.B. Wilson, and P.J. Mason, *Dyskeratosis congenita and telomerase*. Curr Opin Pediatr, 2004. **16**(1): p. 23-8.
234. Deering, R.A., *Dictyostelium discoideum: a gamma-ray resistant organism*. Science, 1968. **162**: p. 1289-1290.

ANEXO:

Artículos que no forman parte de la tesis

❖ **Rodriguez-Centeno, J., and Sastre, L. (2016)**

Biological Activity of the Alternative Promoters of the Dictyostelium discoideum Adenylyl Cyclase A Gene. *PLoS One* **11**, e0148533

❖ **Rosario Perona, Laura Iarriccio, Laura Pintado-Berninches, Javier Rodriguez-Centeno, Cristina Manguan-Garcia, Elena Garcia, Blanca Lopez-Ayllón, Leandro Sastre (2016).**

Molecular Diagnosis and Precision Therapeutic Approaches for Telomere Biology Disorders. Chapter from the book Telomere - A Complex End of a Chromosome (77-117)

RESEARCH ARTICLE

Biological Activity of the Alternative Promoters of the *Dictyostelium discoideum* Adenylyl Cyclase A Gene

Javier Rodriguez-Centeno¹, Leandro Sastre^{1,2*}

1 Instituto de Investigaciones Biomédicas CSIC/UAM, C/Arturo Duperier, 4, 28029, Madrid, Spain, **2** CIBERER, Valencia, Spain

* lsastre@iib.uam.es



OPEN ACCESS

Citation: Rodriguez-Centeno J, Sastre L (2016) Biological Activity of the Alternative Promoters of the *Dictyostelium discoideum* Adenylyl Cyclase A Gene. PLoS ONE 11(2): e0148533. doi:10.1371/journal.pone.0148533

Editor: Gareth Bloomfield, MRC Laboratory of Molecular Biology, UNITED KINGDOM

Received: November 20, 2015

Accepted: January 20, 2016

Published: February 3, 2016

Copyright: © 2016 Rodriguez-Centeno, Sastre. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by grants BFU2008-02249 from the Spanish Ministry of Science and Innovation (Ministerio de Ciencia e Innovación) and PI11/00949 from the Ministry of Health (Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad), supported by FEDER (Federación Española de Asociaciones de Enfermedades Raras) funds.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interest exist.

Abstract

Amoebae of the *Dictyostelium discoideum* species form multicellular fruiting bodies upon starvation. Cyclic adenosine monophosphate (cAMP) is used as intercellular signalling molecule in cell-aggregation, cell differentiation and morphogenesis. This molecule is synthesized by three adenylyl cyclases, one of which, ACA, is required for cell aggregation. The gene coding for ACA (*acaA*) is transcribed from three different promoters that are active at different developmental stages. Promoter 1 is active during cell-aggregation, promoters 2 and 3 are active in prespore and prestalk tip cells at subsequent developmental stages. The biological relevance of *acaA* expression from each of the promoters has been studied in this article. The *acaA* gene was expressed in *acaA*-mutant cells, that do not aggregate, under control of each of the three *acaA* promoters. *acaA* expression under promoter 1 control induced cell aggregation although subsequent development was delayed, very small fruiting bodies were formed and cell differentiation genes were expressed at very low levels. Promoter 2-driven *acaA* expression induced the formation of small aggregates and small fruiting bodies were formed at the same time as in wild-type strains and differentiation genes were also expressed at lower levels. Expression of *acaA* from promoter 3 induced aggregates and fruiting bodies formation and their size and the expression of differentiation genes were more similar to that of wild-type cells. Expression of *acaA* from promoters 1 and 2 in AX4 cells also produced smaller structures. In conclusion, the expression of *acaA* under control of the aggregation-specific Promoter 1 is able to induce cell aggregation in *acaA*-mutant strains. Expression from promoters 2 and 3 also recovered aggregation and development although promoter 3 induced a more complete recovery of fruiting body formation.

Introduction

The amoeba *Dictyostelium discoideum* has been the subject of numerous studies on cell motility, adhesion, cell differentiation and morphogenesis due to the singularity of its biological

cycle (recently reviewed in [1–3]. This organism lives as individual amoebae on forest soils, feeding on bacteria. However, when the food gets exhausted, thousand of amoebae get together and cooperate to form a fruiting body. Multicellular development initiates by the migration of thousands of amoebae towards aggregation centres to form mounds of cells. Cells subsequently initiate alternative differentiation programs, either as prestalk or as prespore cells. Migratory movements and differential adhesion processes result in the location of prestalk cells at the top of the mound, where they protrude as a tip. Subsequently, prestalk cells move towards the substrate, pile up, get elongated and terminally differentiate to form a stalk. During this process prespore cells remain attached to the upper part of the stalk, rising from the substrate to form a globular sorus. Once the culmination process is completed, prespore cells get dehydrated and surrounded by a protein-cellulose coat to form mature spores. Dissemination of the spores facilitates their arrival to a favourable environment where they germinate, reinitiating the biological cycle.

The developmental programme requires cell communication to coordinate cell migration, adhesion and differentiation [3]. One of the more important signalling molecules used by *D. discoideum* is cyclic-AMP (cAMP) [4]. This molecule is used both as a secreted inter-cellular signal and as an intra-cellular second messenger involved in signal transduction [2, 5]. The use of cAMP as an extracellular signal was first characterized in the process of cell aggregation [6]. cAMP is secreted from cells at aggregation centres. Neighbouring cells detect the presence of cAMP and respond by moving towards the increasing cAMP concentration and also by secreting more cAMP, contributing to spread the aggregation signal. This process is periodically repeated and generates cAMP concentration waves that induce the movement of the cells towards aggregation centres [7]. In addition, cAMP acts as an intracellular signalling molecule during this process. Binding of cAMP to cAR1 (cAMP receptor 1) activates several signalling pathways. Some of them activate the chemotactic movement of the cells [8]. cAR1 activation also induces the synthesis of cAMP inside the cells activating the cAMP-dependent protein kinase A (PKA) pathway. cAMP is also secreted [9] contributing to reinforce the cAMP waves [7]. Later on, morphogenetic movements inside the mound are controlled by cAMP waves originating from the tip region of the developing structures [10]. A high extracellular cAMP concentration is also required for the differentiation of prespore cells into spores [11, 12]. Finally, high extracellular cAMP levels avoid precocious germination of the spores inside the sorus [13]. Intracellular cAMP signalling through PKA activation is also required for all these processes [5].

cAMP levels are controlled by the developmentally-regulated expression and activity of adenylyl cyclases and phosphodiesterases [14, 15]. Extracellular phosphodiesterases, such as PDE1, participate in the generation of the cAMP waves. Regulation of the activity of intracellular phosphodiesterases, such as RegA, is required for cAMP secretion, aggregation and cell differentiation. Cyclic AMP is synthesized by three different adenylyl cyclases (AC), ACA, ACR and ACG [16]. The cyclase ACA, encoded by the *acaA* gene, is expressed from the first hours of development and is responsible for cAMP synthesis during the aggregation process. Strains that are mutated at *acaA* do not aggregate [17]. In addition, mutated cells do not express developmentally-regulated genes induced by cAMP such as *csaA*, *tgrC1* or *tgrC5*, that code for proteins involved in cell adhesion [18]. ACB is encoded by the *acrA* gene, whose expression is strongly induced in prestalk cells from six hours of development. Strains mutated at this gene do not complete the culmination process [19, 20]. The gene coding for ACG, *acgA*, is induced in prespore cells from 12 hours of development [17]. ACG activation induces prespore differentiation into spores [21]. In addition, ACG activity is regulated by osmotic pressure, which is high in the sorus, and represses spore germination [13]. This role in spore differentiation and germination has been conserved in several Dictyostelia species [22].

The functional data therefore indicate that *acaA* is the main adenylyl cyclase involved in aggregation. Evolutionary studies are also in agreement with this proposal. Dictyostelia are composed by over one hundred species divided into four groups according to DNA sequence comparisons. Only one of these groups uses cAMP as a signalling molecule during aggregation while the other groups use other chemoattractant molecules such as Glorin, Folic acid or Pterin [23]. However, the regulatory role of cAMP in morphogenesis, spore differentiation and germination, is similar in species from the four groups [4]. These processes seem to be mainly dependent on ACB and ACG, the adenylyl cyclases better conserved among the Dictyostelia. The use of extracellular cAMP as a chemoattractant seems to be a evolutionary acquisition of group four Dictyostelia species [2]. Oscillatory cAMP secretion during aggregation is regulated by the cAMP receptor cAR1 and proteins involved in cAMP synthesis, degradation and intracellular signalling such as ACA and the extracellular phosphodiesterase PdsA [7]. The genes coding for these proteins have in common their expression from different alternative promoters. The more distal promoters are only present in group-four Dictyostelia and drive gene expression at aggregation while more proximal promoters regulate expression at later developmental stages [24–26]. This observation suggests that the capacity to express these genes during aggregation was obtained by adding distal promoter regions [27].

Analyses of the *acaA* gene promoter region identified the existence of three promoters [26]. The one more distal to the coding region directs *acaA* expression during aggregation, as already mentioned. The intermediate promoter direct *acaA* expression in cells of the prespore region and the more proximal one in prestalk cells at the tip region. The expression of *acaA* in specific regions during post-aggregative development indicates that ACA could play a role in cell differentiation and/or morphogenesis. The identification of the three *acaA* promoters opens the way to study their developmental functions. Complementation studies of *acaA* mutant strains using the three promoters to drive expression of the gene are, therefore, reported in this article. Expression of *acaA* from the distal, aggregation-specific, promoter is sufficient for aggregation. However, the developmental process also requires *acaA* expression from promoter 3 for complete recovery of fruiting body morphology and patterns of gene expression.

Materials and Methods

Cell culture and transformation

D. discoideum cells were grown axenically in HL5 media. Cells were alternatively grown feeding on *Klebsiella aerogenes* over SM-agar plates. Cells were transformed by electroporation as previously described [28]. Transformed cells were selected by culture in HL5 media in the presence of 5 µg/ml blasticidin or 10 µg/ml geneticin (G418).

Multicellular development

Development into fruiting bodies was induced by centrifugation of the cells and spreading of 2×10^7 cells resuspended in PDF buffer (20 mM KCl, 9 mM K_2HPO_4 , 13 mM KH_2PO_4 , 1 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgSO_4$, pH 6.4) on 37-mm Nitrocellulose filters supported by pads saturated in buffer. Cell aggregation was also observed by incubating 10^6 cells in 2 ml of PDF Buffer in 37-mm cell-culture dishes.

RNA extraction, Reverse transcription and quantitative PCR

D. discoideum developing structures were obtained by spreading 2×10^7 cells on Nitrocellulose filters soaked on PDF buffer. Cells and structures were collected at the indicated times and the RNA extracted using 1 ml of the TRI Reagent (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA)

according to the manufacturer's instructions. Isolated RNAs were incubated with DNase I and further purified using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). Complementary DNAs were generated from 2 µg of RNA using random hexanucleotides as primers (Promega Co., Madison, WI, USA) and the M-MLV reverse transcriptase (Promega Co., Madison, WI, USA). Quantitative PCR reactions were carried on the Step One Real-Time PCR System (Life Technologies, Co. Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). The Power SYBR[®] Green PCR Mix (Applied Biosystems) was used for these reactions. The conditions used for the PCR reactions have been described previously [29]. The comparative threshold cycle method [30] was used to determine relative gene expression levels using the large mitochondrial rRNA as endogenous control. The oligonucleotides used as primers are indicated in [S1 Table](#).

Generation of *acaA*-mutant AX4 strains

D. discoideum AX4 cells were transfected with a plasmid vector designed to interrupt the *acaA* gene by homologous recombination, kindly provided by Zhi-Hui Chen and Pauline Schaap. Mutant strains were isolated by culture with 5 µg/ml blasticidin and the existence of homologous recombination tested by PCR reactions. Mutant strains did not form aggregates when cultured on *K. aerogenes*.

Generation of plasmid vectors

The plasmid vector pDneo2a-6xMYC [31] was used for *acaA* expression. The XbaI-PstI DNA fragment of the pDneo2a-6xMYC vector containing the Actin 6 promoter was replaced by each of the three *acaA* promoters, obtained by PCR reactions. The oligonucleotides used are shown in [S1 Table](#). The *acaA* protein-coding region was subsequently cloned in the vectors that contained the *acaA* promoters using the PstI and BamHI restriction sites. These restriction sites were incorporated to the *acaA* coding region by PCR using the oligonucleotides shown in [S1 Table](#).

Results

The *acaA* gene was interrupted by homologous recombination in the *D. discoideum* AX4 strain, used for the previous characterization of the *acaA* promoters ([S1 Fig](#)). The mutant strain 1 was subsequently transfected with plasmid vectors that express *acaA* under transcriptional control of the three *acaA* promoters. The relative levels of *acaA* mRNA expressed at different developmental stages were determined by RT-qPCR, as shown in [Fig 1](#). The data obtained are in good agreement with those previously reported for the activity of the promoters using short-lived *lacZ*-expression vectors, with the exception of Promoter 3 [26]. The aggregation-specific Promoter 1 is the first one to be activated with maximal expression at 6 hours of development. Promoter 2 showed maximal activity between 9 and 12 hours of development and is the strongest promoter region with about five times more activity than promoters 1 and 3 (right Y-axis in [Fig 1](#)). Promoter 3 is active from 3 hours of development showing maximal expression at 12 hours and maintaining about 50% of maximal expression at later developmental stages. However, reporter vector studies showed that this promoter was activated only after 10 hours of development in wild-type AX4 cells, as will be discussed later. Expression from the three *acaA* promoters in the mutant strain was compared with the endogenous *acaA* mRNA expression from the Wild-type (WT) and *acaA*-KO strains ([Fig 1](#)). The *acaA* KO strain showed background expression levels throughout development while the WT strain showed the described pattern of *acaA* expression that is maximal between 6 and 9 hours of development. The expression levels of the *acaA* mRNAs from the complemented strains shown in [Fig 1](#) were made relative to the WT *acaA* expression in vegetative cells (0 hours of development) to compare

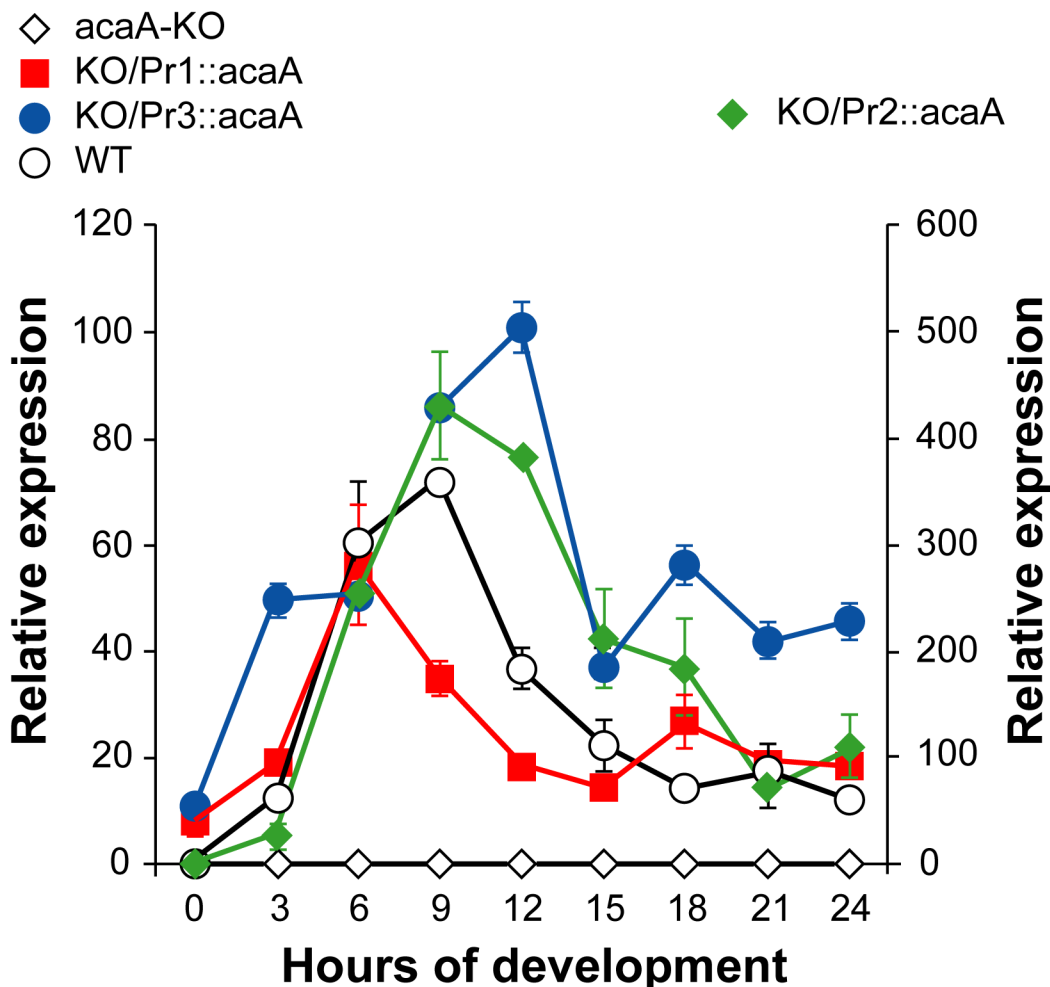


Fig 1. Expression of *acaA* mRNA in Wild-type, *acaA*-mutant and complemented strains. Multicellular development of wild-type AX4 cells (WT), AX4 *acaA* mutant cells (*acaA*-KO) and mutant cells transformed with vectors that express *acaA* from the *acaA* promoters 1 (KO/Pr1::*acaA*), 2 (KO/Pr2::*acaA*) or 3 (KO/Pr3::*acaA*) was induced by spreading 2×10^7 cells on Nitrocellulose filters. Cells were collected before spreading (time 0) or every three hours of development (3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 and 24 hours). RNA was extracted and the levels of *acaA* mRNA determined by reverse transcription and quantitative PCR. The mitochondrial large ribosomal RNA was used as internal control. Relative expression levels are expressed in relation of those of AX4 undifferentiated cells (WT, time 0) for all strain. The left Y axis indicates WT, *acaA*-KO, KO/Pr1::*acaA* and KO/Pr3::*acaA* expression levels and the right Y axis KO/Pr2::*acaA* expression levels. Average values and standard deviations of three experiments made in triplicate are represented.

doi:10.1371/journal.pone.0148533.g001

relative levels of expression. The data obtained indicate that promoters 1 and 3 induced levels of *acaA* expression close to those of the WT strain, 60–100 times of maximal induction in the complemented strains compared to 70 times in the WT. In contrast expression levels driven by promoter 2 were about 5 times higher than the WT ones, as mentioned above in the comparison to promoters 1 and 3.

It has been described that *acaA* mutant strains do not aggregate because of the absence of synthesis of the cAMP required for chemotaxis. It is expected that *acaA* expression in the KO strain would recover aggregation and/or subsequent developmental processes. The formation of cell aggregates was first studied by starvation of cells submerged in buffered solutions. The *acaA*-KO AX4 cells did not aggregate even after 48 hours of incubation (Fig 2). Mutant cells expressing the Pr1::*acaA* construct were polarized and migrated to form cell aggregates as wild-type cells although the aggregates formed were looser and tight aggregates were not

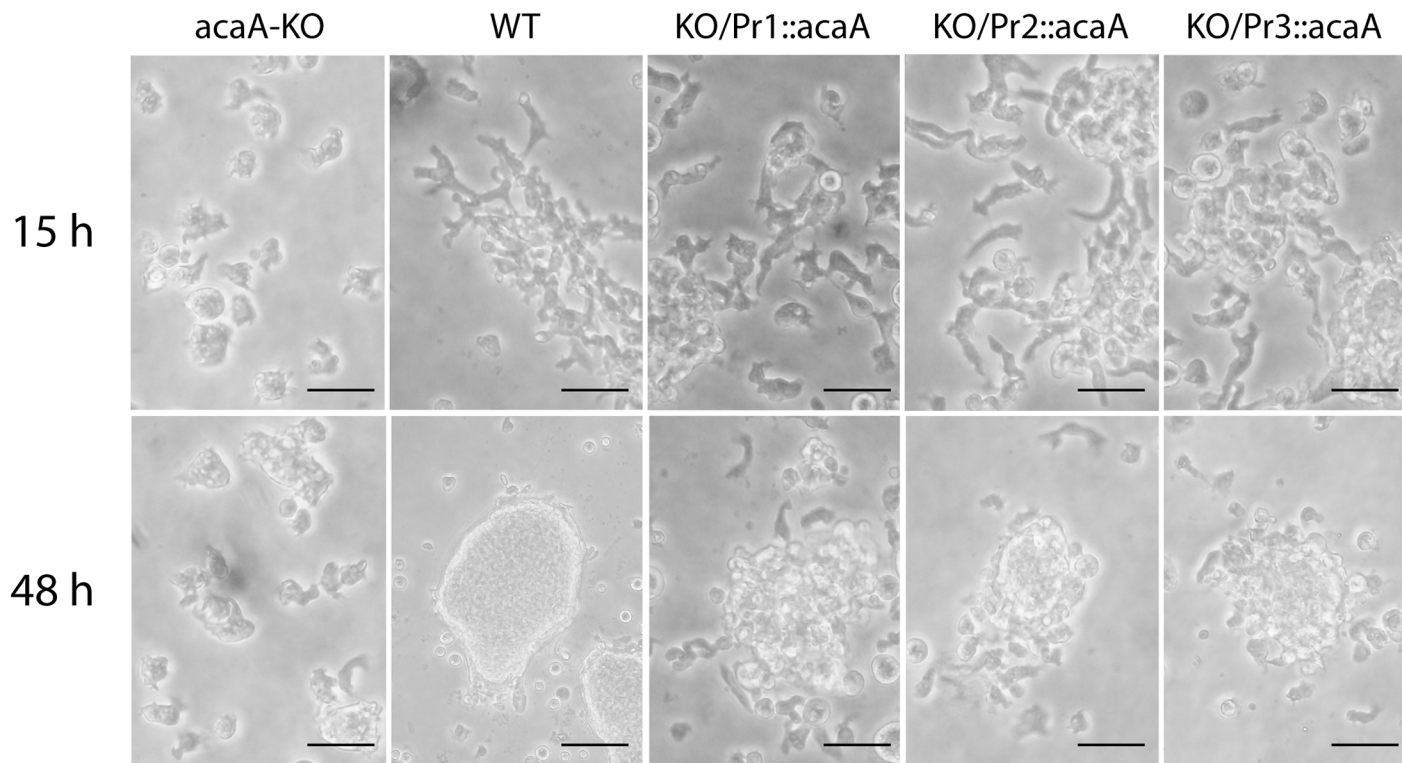


Fig 2. Development of complemented strains under submerged conditions of culture. Wild-type cells (WT), *acaA*-mutant (*acaA*-KO) or *acaA*-mutant cells transfected with *acaA*-expression plasmids vectors under control of the *acaA* promoters 1 (KO/Pr1::*acaA*), 2 (KO/Pr2::*acaA*) or 3 (KO/Pr3::*acaA*) were suspended in Phosphate-based PDF buffer and cultured on plastic dishes. Cell morphology and aggregation were observed after 15 (panel A) or 48 (panel B) hours of culture. Scale bar: 10μm.

doi:10.1371/journal.pone.0148533.g002

observed after 48 hours of incubation (Fig 2A). Mutant cells expressing Pr2::*acaA* and Pr3::*acaA* constructs were also polarized by 15 hours of starvation (Fig 2) and formed tight aggregates by 48 hours (Fig 2). Cell aggregates were, however, smaller than those formed by the wild-type strain under these conditions.

Post-aggregation development was studied by starving the cells on top of Nitrocellulose filters. Wild-type cells formed aggregates by 15 hours of starvation. Aggregated cells then proceeded into a morphogenetic program to form fruiting bodies and culminating structures could be observed by 24 hours of development (Fig 3, WT). Cells where the *acaA* gene had been knocked out did not form aggregates and later developmental structures, as already mentioned. Expression of the Pr1::*acaA* construct in *acaA*-KO cells recovered cell aggregation (Fig 3 KO/Pr1::*acaA*) but posterior development was slowed down. Only a reduced number of very small finger structures and fruiting bodies were formed by 24 hours of development (Fig 3 KO/Pr1::*acaA*). Mutant cells expressing the Pr2::*acaA* construct formed aggregates by 15 hours of development that were smaller than the WT ones. Post-aggregation development was not completely recovered and very few small fruiting bodies were observed 24 hours after starvation (Fig 3 KO/Pr2::*acaA*). Expression of *acaA* under control of Promoter 3 in *acaA*-KO cells almost completely recovered the developmental process (Fig 3 KO/Pr3::*acaA*).

The development of each strain was characterized in more detail by determining the temporal pattern of expression of four genes involved in aggregation, cell adhesion or differentiation. Among these genes, *carA* codes for the cAMP receptor 1 and is expressed in the first stages of the developmental program. This receptor is activated by extracellular cAMP, initiating

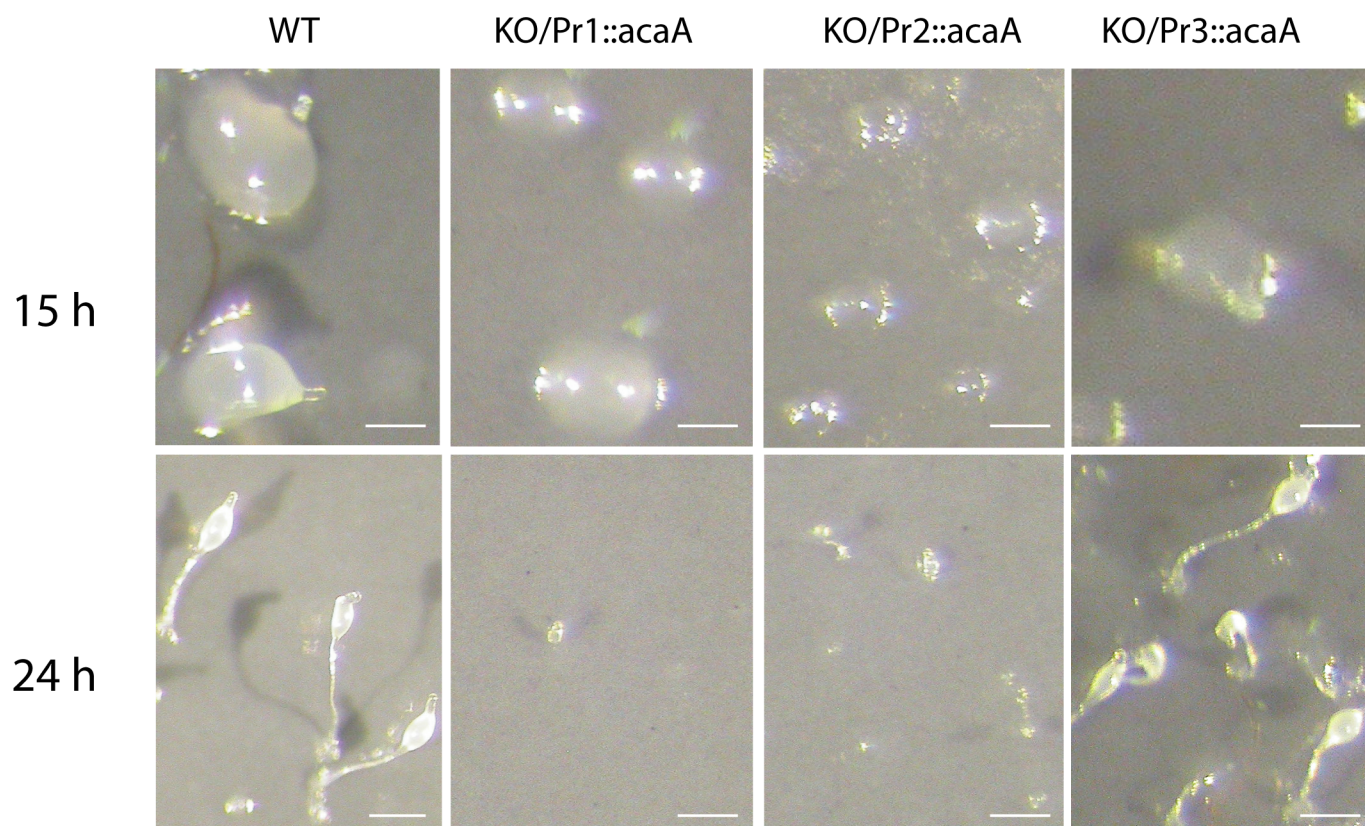


Fig 3. Development of the complemented strains on Nitrocellulose filters. The development of wild-type cells (WT) and *acaA*-mutant cells transfected with *acaA*-expression plasmids under control of the *acaA* promoters 1 (KO/Pr1::*acaA*), 2 (KO/Pr2::*acaA*) or 3 (KO/Pr3::*acaA*) was studied. Cells from the different strains were harvested, suspended on PDF buffer and deposited on Nitrocellulose filters at a concentration of 1.2 Cells/cm². Pictures were taken at 15 and 24 hours of culture. Scale bar: 0.1 mm.

doi:10.1371/journal.pone.0148533.g003

signalling pathways that induce cAMP synthesis and cell migration. Both activities are required for cell aggregation. The initial induction of *carA* expression is dependent on cell starvation but independent of extracellular cAMP signalling [32]. The second gene analyzed, *tgrC5*, codes for a protein involved in cell adhesion that is required for mound compaction and cell type segregation. In contrast to *carA*, the induction of *tgrC5* is dependent on the previous existence of extracellular cAMP signalling [33].

The expression pattern of *carA* and *tgrC5* genes during development of WT, *acaA*-KO and KO strains expressing *acaA* under control of the three *acaA* promoters is shown in Fig 4. The expression of *carA* is induced during the first hours of development, with maximal expression at 6–9 hours. As expected, the temporal expression pattern is similar in the WT and *acaA*-KO strains since it is not dependent on cAMP signalling. However, *carA* mRNA levels are lower in the *acaA*-KO strain than in the WT and complemented KO strains indicating stimulation of *carA* expression by cAMP signalling. The expression of *tgrC5* is dependent on cAMP signalling and this gene is not induced in the *acaA* KO strain. Expression of *acaA* under control of any of the promoters resulted in the induction of *tgrC5* expression. The induction was observed at 6 hours of development with maximal levels at 12–15 hours in the WT and complemented strains (Fig 4).

The other two genes studied, *ecmA* and *pspA*, are expressed in differentiated prestalk and prespore cells, respectively [34, 35]. Their induction is dependent on the correct fulfilment of

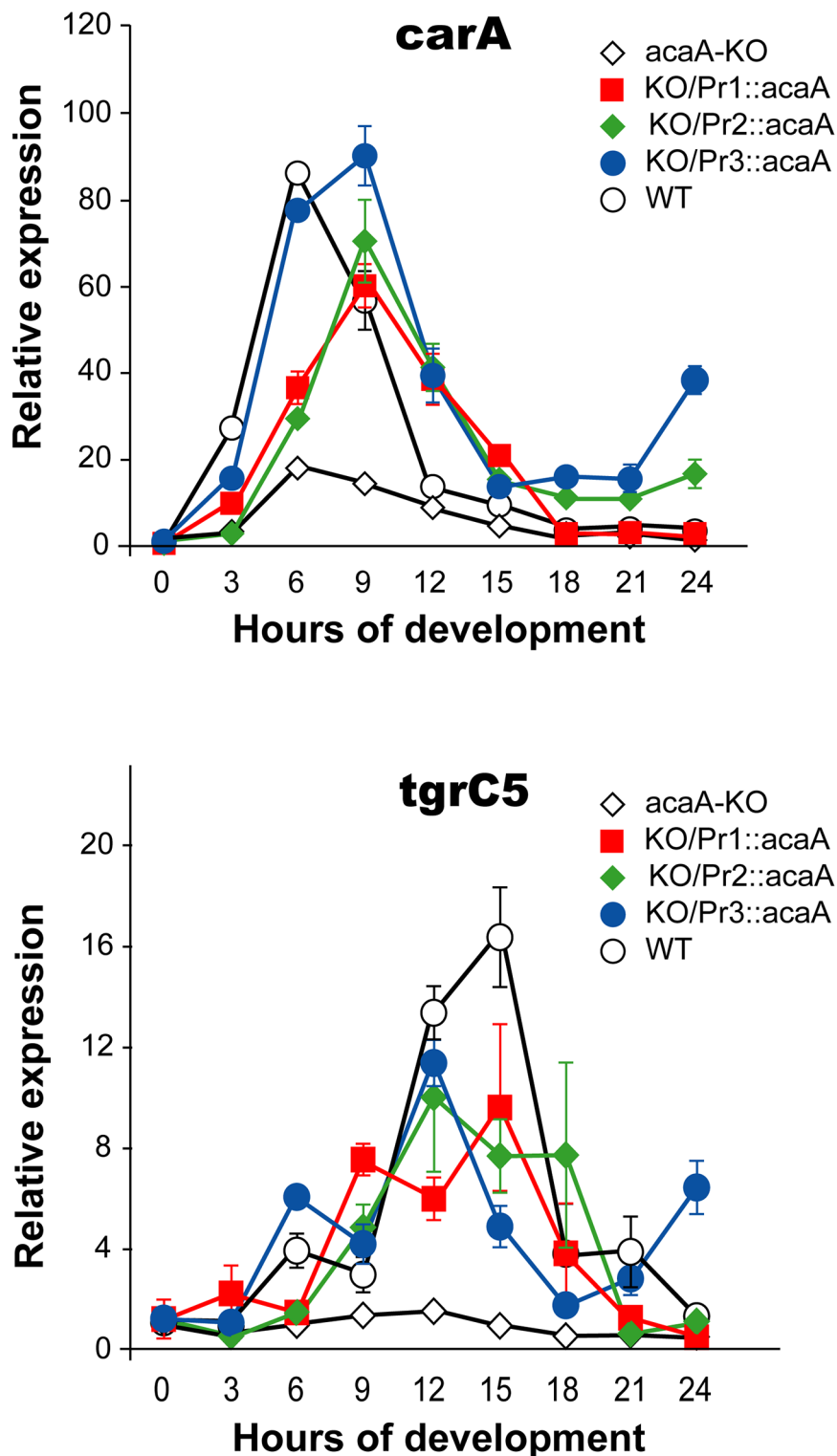


Fig 4. Expression of aggregation-specific genes in complemented *acaA*-mutant strains. Cells from the wild-type AX4 strain (WT), the *acaA*-mutant strain (*acaA*-KO) or the mutant strain transformed with *acaA* expression vectors under control of the *acaA* promoters 1 (KO/Pr1::*acaA*), 2 (KO/Pr2::*acaA*) or 3 (KO/Pr3::*acaA*) were deposited on Nitrocellulose filters soaked on the phosphate-based PDF Buffer to induce development. RNAs were isolated from cells collected either before placing them on the filters (time 0) or at different times of development (3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 and 24 hours). The expression of the genes coding for

cAMP receptor 1 (*carA*, upper panel) and the cell-adhesion molecule *TgrC5* (*tgrC5*, lower panel) was determined by reverse transcription and quantitative PCR. Expression of the mitochondrial large ribosomal RNA was used as internal control. Expression at each developmental stage was normalized to that of non-starved cells (time 0) for each gene and strain. Average values and standard deviations of three experiments made in triplicate are represented.

doi:10.1371/journal.pone.0148533.g004

previous developmental processes and is used as indicator of developmental progress. The expression patterns observed for the prestalk and prespore genes are shown in Fig 5. None of the genes is expressed in *acaA* KO strain. However, both genes are expressed in the *acaA*-KO strains expressing *acaA* from the three promoters, and in the WT strain, from 15 hours of development onwards. Expression levels were, however, very different (Fig 5). The expression of both genes was induced several thousand times in the WT strain, in comparison to proliferating cells (0 hours of development). Comparable levels of expression were only obtained in the *acaA*-KO strain expressing the Pr3::*acaA* construct. The *acaA*-KO strains expressing Pr1::*acaA* and Pr2::*acaA* showed limited *ecmA* and *pspA* induction, 25–30 and 150–250 times respectively, indicating lower levels of prespore and prestalk cells differentiation.

Previous studies had shown that *acaA* over-expression produced small aggregation fields and small fruiting bodies [36] [37]. The *acaA*-KO strain transfected with Pr1::*acaA* and Pr2::*acaA* plasmid vectors resulted in small fruiting bodies and induced *acaA* expression levels higher than those of the wild type strain, as determined by RT-qPCR. We wanted to determine if this high expression levels could have any functional consequences on the developmental process. Therefore, the wild type AX4 strain was transfected with the three *acaA* expression vectors. Comparative levels of expression of *acaA* mRNAs transcribed from the endogenous gene or from the plasmid vectors were compared by RT-qPCR using specific pairs of oligonucleotides. Reverse primers complementary to the 3' untranslated region, immediately downstream of the stop codon from the endogenous gene or the expression vector and a common forward primer from the *acaA* coding region (S1 Table) were used in these experiments. The results obtained were made relative to the endogenous *acaA* mRNA expression level in vegetative cells (0 hours) for each strain (Fig 6). The temporal patterns of expression of *acaA* expressed from the plasmid vectors from promoters 1 and 2 were similar to those observed in the *acaA*-KO strain (Fig 1), although not identical. Promoter 1 showed higher expression at 3 hours in the WT strain. The endogenous *acaA* mRNA showed maximal expression at 6 hours of development although induction levels were lower than those observed in untransfected WT cells, 70 times versus 30 times (compare Figs 1 and 6). Therefore, expression from this promoter preceded the peak of induction of the endogenous gene by 3 hours. Promoter 2 drove maximal expression at 9 hours in WT and *acaA*-KO cells. The temporal pattern of expression was very similar to that of the endogenous gene although the relative expression obtained from the plasmid (1200 times) was much higher than that of the endogenous gene (75 times, Fig 6), in concordance with the data obtained in the *acaA*-KO strain. Promoter 3 induced maximal relative expression at 6 hours of development in the WT strain, which is in contrast with the results obtained in *acaA*-KO cells (maximal induction at 12 hours, Fig 1). Induction of the endogenous *acaA* mRNA is low in the WT/Pr3::*acaA* strain, 6 times of maximal induction at 6 hours of development, as compared with 70 at untransfected WT cells. These results could indicate a regulatory interaction between Promoter 3 and the endogenous gene that is not observed for promoters 1 and 2, as discussed later.

The multicellular development of the different AX4 strains was studied in submerged development and on Nitrocellulose filters (Fig 7). The three strains that expressed *acaA* showed the same temporal pattern of development as AX4 cells. Cell streams were formed by 15 hours of submerged development (Fig 7, upper panels). In filter development, tipped aggregates were

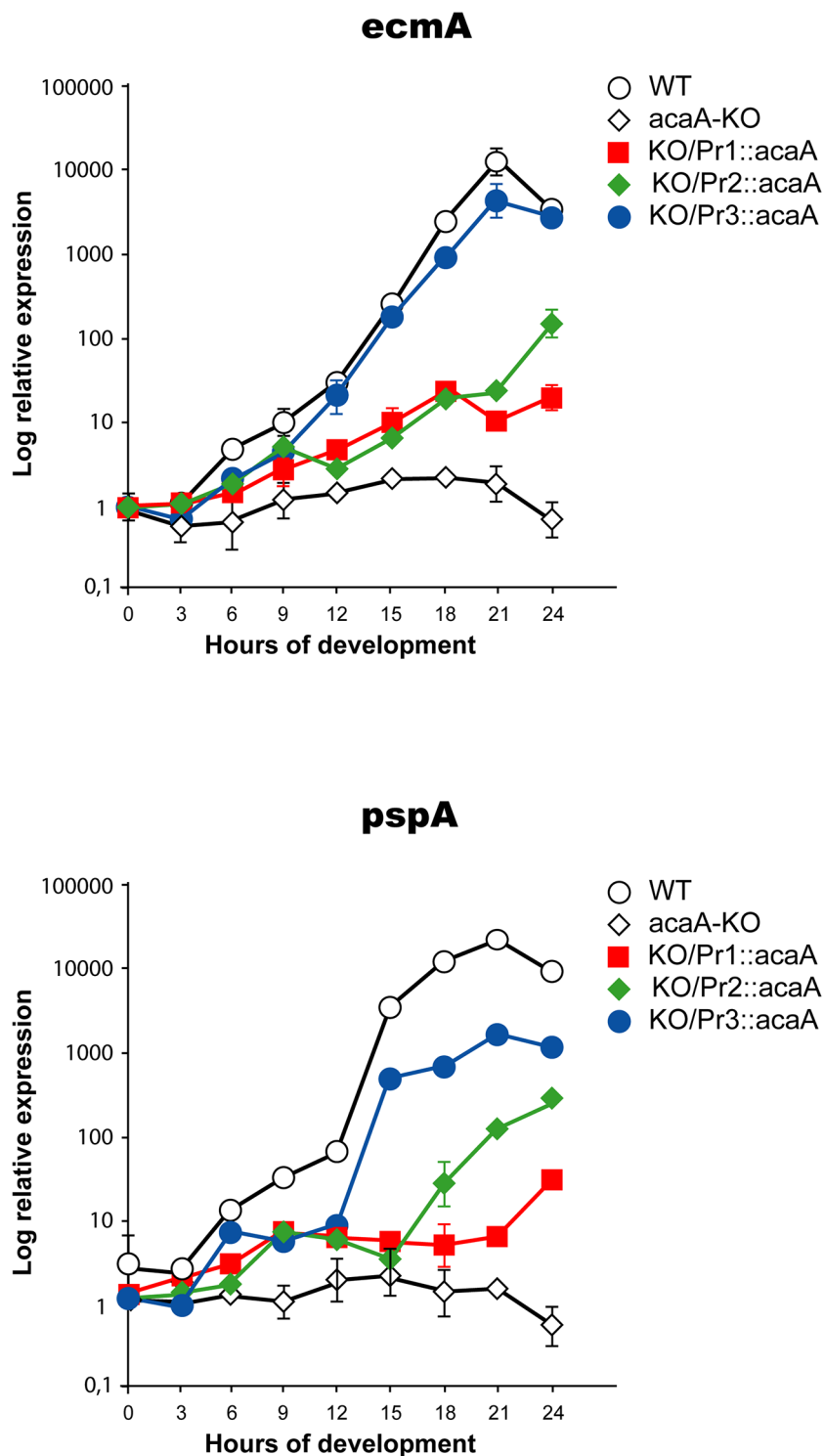


Fig 5. Expression of cell differentiation genes in complemented *acaA*-mutant strains. Cells from the wild-type AX4 strain (WT), the *acaA*-mutant strain (*acaA*-KO) and the mutant strain transfected with vectors that drive *acaA* expression under control of each of the *acaA* promoters 1 (KO/Pr1::acaA), 2 (KO/Pr2::acaA) or 3 (KO/Pr3::acaA) were deposited on PDF-soaked Nitrocellulose filters. Cells were collected either before starvation (time 0) or after several culture periods (3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 and 24 hours) and their RNA extracted. The relative expression levels of the prestalk-specific *ecmA* gene (upper panel) and the prespore-specific *pspA* gene (lower panel) were determined by reverse transcription and quantitative PCR. Expression

levels were normalized using the mitochondrial large ribosomal RNA expression levels and made relative to the expression observed in non-starved cells (time 0). Results are represented on a logarithmic scale in the Y axis. Average values and standard deviations of three experiments made in triplicate are represented.

doi:10.1371/journal.pone.0148533.g005

observed by 15 hours of development (Fig 7, middle panels) and fruiting bodies by 24 hours. However, the size of the aggregates and mounds of the strains expressing *acaA* from promoters 1 and 2 was smaller than that of WT and promoter 3-driven structures. Fruiting bodies were allowed to complete maturation (36 hours, Fig 7 lower panels) and the size of the sporocarpi determined. The diameter of the sori from the WT/Pr1::*acaA* strain was $37.2 \pm 15\%$ that of the WT ones. Similarly, the diameter of the WT/Pr2::*acaA* strain sori was $34.0 \pm 12.3\%$, while the diameter of WT/Pr3::*acaA* sori was $75.0 \pm 17.2\%$ of the ones of the WT strain.

Discussion

Expression of the *acaA* gene is regulated by three promoters, that are active at different developmental stages and/or regions of the developing structures [26]. In this article, the *acaA* gene was expressed under the control of each of these promoters in an *acaA*-mutant AX4 strain. The more distal promoter, Promoter 1, is active at the initial cell aggregation stage that is mediated by extracellular cAMP in *D. discoideum* [23]. Expression of *acaA* under control of this promoter recovered aggregation in the *acaA*-mutant strain, as evidenced by the morphological change of the cells and the formation of aggregates under submerged conditions and on Nitrocellulose filters, the expression of the *tgrC5* gene, that is dependent on extracellular cAMP signalling, and of prestalk and prespore genes. Basal expression of *carA* is not dependent on cAMP signalling [32] and the gene is expressed in the *acaA*-KO strain. However, expression of *acaA* under control of promoter 1 (and also promoters 2 and 3) increased *carA* mRNA levels in agreement with previous studies indicating that *carA* expression is regulated by cAMP [35, 38]. Expression of *acaA* under Promoter 1 produced aggregates smaller than wild-type cells and less tightly packed indicating that additional activation of *acaA* expression driven by promoters 2 and/or 3 could be required for a strong aggregation process. Post-aggregative development was poorly recovered by *acaA* expression driven by promoter 1 and only few, small, structures were formed. The prespore gene *pspA* and the prestalk gene *ecmA* were also expressed to much lower levels than in wild-type structures at 24 hours of development, indicating that very few cells differentiated into prespore or prestalk cells.

Expression of *acaA* under control of promoter 2 resulted in formation of tight aggregates and the expression of cell adhesion molecules, such as *tgrC5*, was induced. However, aggregates were smaller than wild-type ones and few, small, culminant structures were formed. In agreement with these data, the expression of *ecmA* and *pspA* was very low in the strains complemented from promoter 2. The developmental pattern of *acaA* expression shown in Fig 1 indicates that promoters 2 induced very high levels of *acaA* mRNA with maximal expression at 9 hours of development, as WT cells.

acaA expression driven by promoter 3 resulted in the more complete recovery of the developmental process. These data are in agreement with previous results showing that a smaller fragment of the promoter 3 region analyzed in this article [39] and a promoter 3 fragment fused to part of promoter 2 [40] recovered the development of *cbfA* and *acaA* mutants generated in the DH1 *D. discoideum* strain, respectively. Promoters 2 and 3 differed at the cell type where they are active, prespore cells in the case of promoter 2 and prestalk tip cells in the case of promoter 3. This difference could be important for their distinct biological activity since prestalk cells have been described as an important signalling centre during intermediary stages of *D. discoideum* development such as finger formation, slug migration and the initiation of

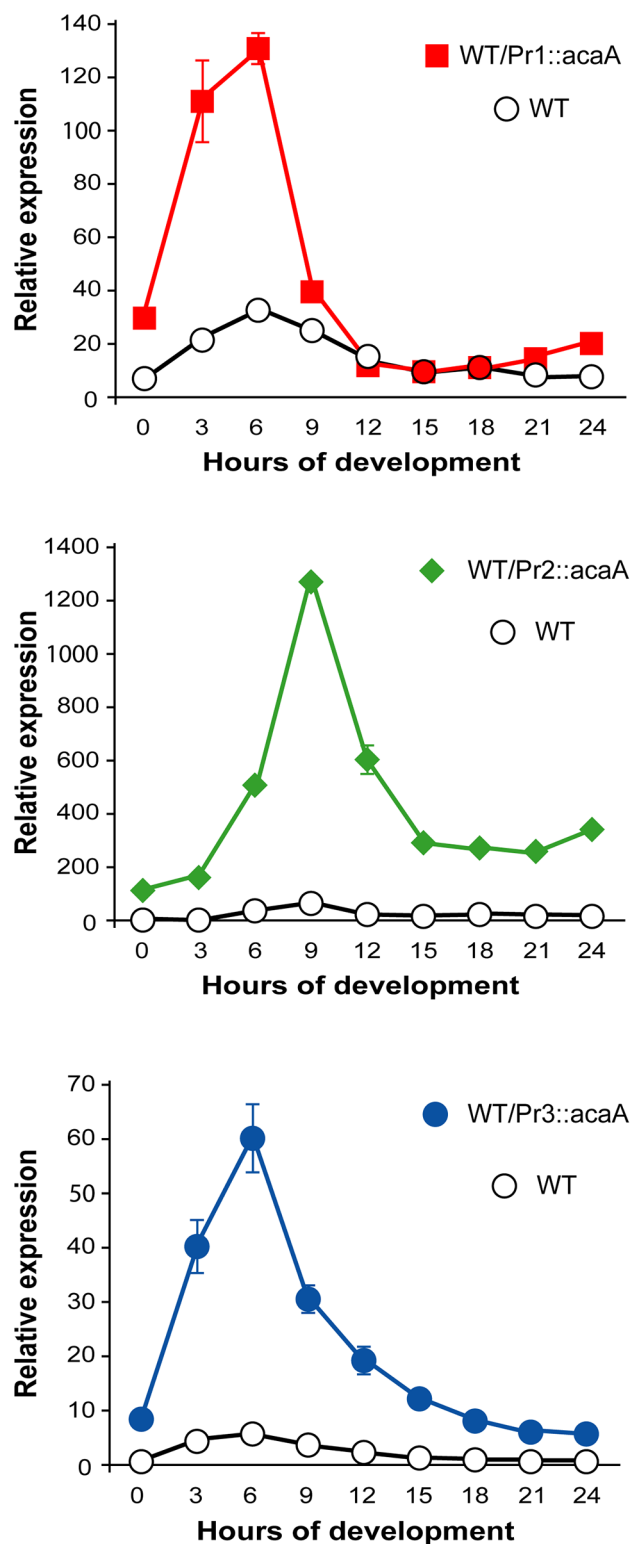


Fig 6. Developmental patterns of *acaA* expression observed in WT strains that express *acaA* under control of the three *acaA* promoters. The plasmids containing the *acaA* gene under control of the three *acaA* promoters were transfected in wild-type AX4 cells. Transfected cells were deposited on Nitrocellulose filters soaked on PDF buffer to induce multicellular development. Cells were collected either before starvation (time 0) or after different times of culture on the filters (3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 and 24 hours) and their RNA

isolated. Expression levels of the endogenous gene (WT) and the *acaA* mRNA transcribed from the three expression vectors (WT/Pr1::*acaA*; WT/Pr2::*acaA*; WT/Pr3::*acaA*) were determined by reverse transcription and quantitative PCR. Expression patterns of AX4 strains transfected with the Pr1::*acaA* (upper panel), Pr2::*acaA* (middle panel) and Pr3::*acaA* (lower panel) vectors are shown. The mitochondrial large ribosomal RNA was used as internal control and the expression values made relative to those of the endogenous *acaA* mRNA of non-starved cells (WT; time 0) in each panel. Average values and standard deviations of two experiments made in triplicate are represented.

doi:10.1371/journal.pone.0148533.g006

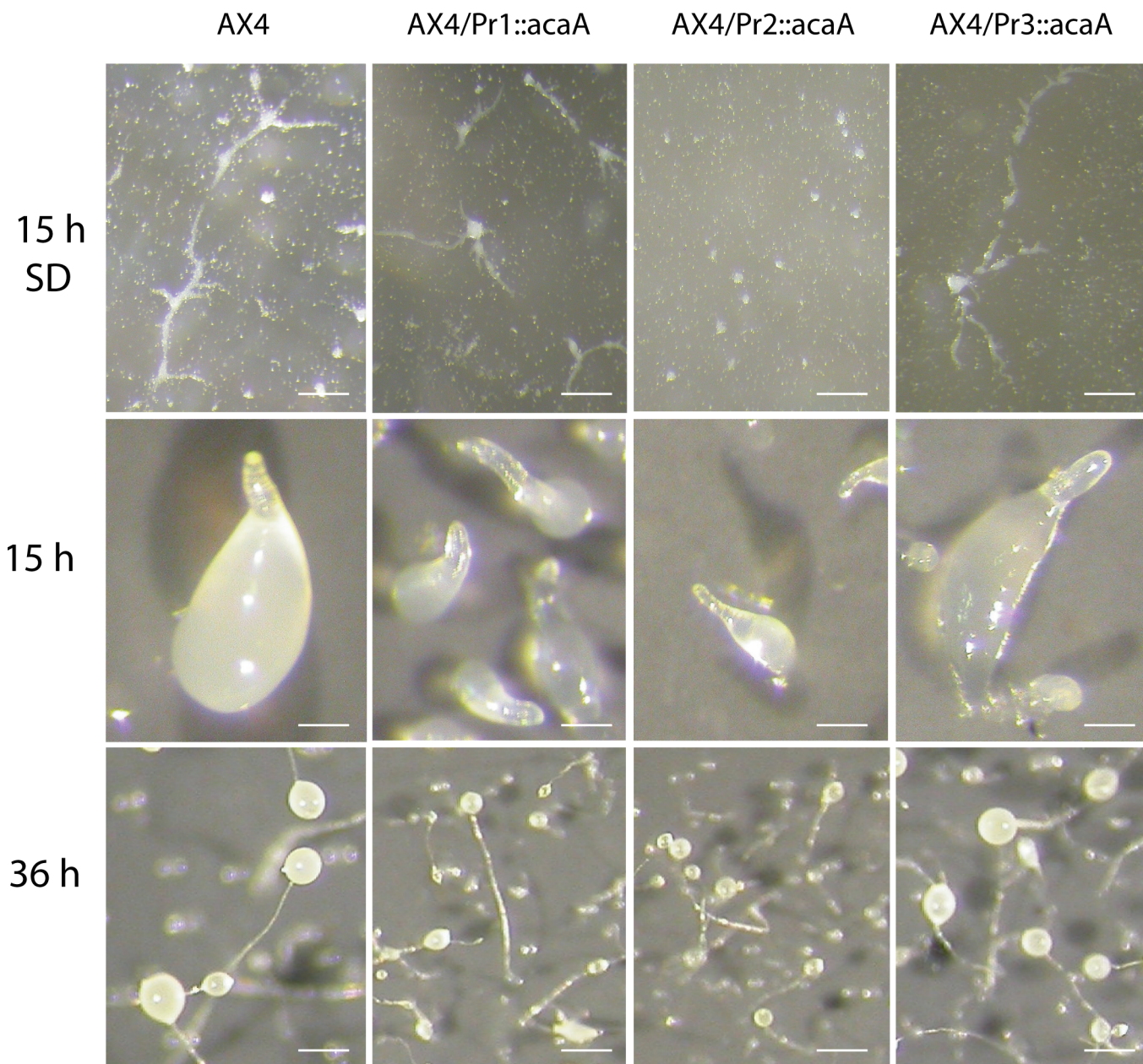


Fig 7. Development of the AX4 cells expressing *acaA* from the three *acaA* promoters. WT Ax4 cells were transfected with the expression vectors driving *acaA* expression from each of the three *acaA* promoters (WT/Pr1::*acaA*; WT/Pr2::*acaA*; WT/Pr3::*acaA*). Upper panels show the aggregation streams formed after development of these cells and the WT cells (AX4) under submerged conditions for 15 hours. The two lower panels show their development when deposited on Nitrocellulose filters and incubated for 15 and 36 hours, respectively. Scales bars: 40 μ m (upper panels), 0.1 mm (middle panels) and 0.2 mm (lower panels).

doi:10.1371/journal.pone.0148533.g007

culmination [41, 42]. Adenylyl cyclase A has been previously shown to play a relevant role in this signalling pathway [40]. Expression of *acaA* in prestalk tip cells could complement this signalling process in the mutant strain to produce a more robust developmental process and larger structures. These data would enforce the importance of *acaA* expression at the prestalk region.

acaA expression levels have an important role in developmental regulation since previous reports showed that *acaA* expression under control of a strong, constitutive actin promoter resulted in small structures [36, 37]. Over-expression of *acaA* could impair the aggregation process by reducing the size of the aggregation field. This could be the case when *acaA* is expressed from promoter 1 in WT cells since expression of this gene is induced precociously, at 3 hours of development, and at higher levels than the endogenous gene (Fig 6). It could be also the case for promoter 2-driven expression where the temporal pattern of expression is similar to that of the endogenous gene but expression levels are about 100 times higher (Fig 6). Over-expression driven by promoter 2 could also impair post-aggregative development since an inhibitory role of cAMP on stalk cell differentiation has been described [43, 44]. However, the structures formed by the *acaA*-KO strain expressing Pr1::*acaA* and Pr2::*acaA* were much smaller than those of the AX4 strain expressing these constructs. Therefore, *acaA* over-expression is not the only reason for the small size of the structures formed by the mutant strain which indicates that expression from promoters 1 and 2 do not completely complement the *acaA* expression required for post-aggregative development. In contrast, expression of *acaA* from promoter 3 in WT cells did not affect the developmental process significantly and only a discrete decrease in the size of the fruiting bodies was observed.

Although the biological activity of promoter 3 is consistent in WT and *acaA*-KO strains, significant differences in the pattern of activity during development were found. In addition, the activity of promoter 3 had been previously studied using a β -galactosidase expression vector in wild-type AX4 cells [26]. In these studies significant induction of promoter 3 was observed only after 10 hours of development although β -galactosidase activity was observed in mound and tipped mound structures. However, *acaA* expression driven from this promoter was observed at earlier developmental stages in the present study, specially in AX4 cells. The differences described could be due to several reasons. One of the variables that could affect these results is the gene being expressed in each experiment. For example, the differences observed on β -galactosidase and *acaA* mRNAs expression could be due to a feed-back activation of promoter 3 by cAMP at early developmental stages. According to this hypothesis, high cAMP levels would be obtained by *acaA* expression that could increase promoter 3 activity. Greater stability of the β -galactosidase mRNA than the *acaA* mRNA could also contribute to increase β -galactosidase mRNA levels at late developmental stages.

A second source of variation is the strain used in each study. As mentioned above, *acaA* expression from promoter 3 was induced earlier in WT than in *acaA*-KO cells. The difference could be explained if promoter 3 activity is regulated by extracellular signals that are present in the WT strain and not in the *acaA*-KO strain.

A third important factor that could affect promoter 3 activity is the genomic context. In the previous study mentioned above the patterns of expression of the *acaA* mRNAs transcribed downstream of each promoter were determined. There is a good correlation with the data obtained previously for mRNAs 1 and 2, transcribed downstream of promoters 1 and 2 and the *acaA* mRNA expression driven by these promoters. Promoter 1 drove maximal expression between 3 and 6 hours in AX4 cells (Fig 6) and *acaA* mRNA1 showed maximal expression between 4 and 6 hours [26]. Promoter 2 activity was maximal at 9 hours (fig 6) and mRNA2 showed maximal expression between 8 and 10 hours [26]. Promoter 3 activity and mRNA3 expression showed very different expression levels, however. Induction of mRNA3 was only

observed after 10 hours of development [26] while promoter 3 activity was maximal at 6 hours of development in WT cells (Fig 6). One possible explanation for these results is that regulatory elements present in promoters 1 or 2 or in other regions of the genome could also control mRNA3 expression. These interactions could explain the different pattern of expression under control of the isolated promoter 3 region or by the endogenous gene regulatory elements. Regulatory interactions are also observed in the decreased expression of the endogenous *acaA* mRNA in wild type cells when *acaA* is expressed under control of promoters 1 and 3 (Fig 6). Altogether, these data could indicate that promoter 3 activity is regulated in response to both intracellular and extracellular signals in cooperation with regulatory elements present in other genomic regions. The characterization of these possible regulatory regions and the regulation of their activity during development will require further detailed studies.

Conclusions

The data reported in this article highlight some of the roles played by the three *acaA* promoters during development. In particular, expression from the aggregation-specific promoter 1 recovered aggregation but the expression from the tip-specific promoter 3 resulted in the more complete recovery of post-aggregative development. Expression of *acaA* in WT cells from promoters 1 and 2 resulted in smaller developmental structures, probably due to increased cAMP signalling during the aggregation process. The results obtained also indicate a complex regulation of *acaA* promoter 3 activity during development.

Supporting Information

S1 Fig. Analysis of *acaA*-mutant colonies generated by homologous recombination. *D. discoideum* AX4 cells were transfected with a plasmid vector where two adjacent regions of the *acaA* gene coding region (black boxes at the lower panel of the figure) were separated by a Blasticidine-resistance cassette (BsR, White box). Transformed colonies were selected by culture in the presence of blasticidine. Resistant clones were isolated by culture on agar plates overloaded with *K. aerogens*. DNA was prepared from three independent clones and used for PCR amplification using oligonucleotides hybridizing to the blasticidine-resistant cassette (Bsr-2, S1 Table) and to the *acaA* gene coding region downstream of the fragment used for construction of the KO plasmid vector (*acaA* S17, S1 Table), indicated by arrows in the lower panel of the figure. The products obtained were analyzed on an agarose gel as shown on lines 1, 2 and 3 of the upper panel of the figure. The migration of molecular weight markers is shown on lane M and their size in base pairs indicated at the right of the picture. DNA from clones 1 and 3 allowed amplification of the expected fragment of 1150 bp indicating the incorporation of the blasticidine cassette inside the *acaA* gene by homologous recombination. Clone 2 also incorporated the plasmid construct, as shown by the resistance to blasticidine, but it was not incorporated into the *acaA* gene.

(PDF)

S1 Table. Oligonucleotides.

(PDF)

Acknowledgments

The authors are indebted to Zhi-Hui Chen and Pauline Schaap (University of Dundee, Dundee, UK) for the plasmid vector used to generate the *acaA*-mutant strain by homologous recombination. This work was supported by grants BFU2008-02249 from the Spanish Ministry of Science

and Innovation (Ministerio de Ciencia e Innovación) and PI11/00949 from the Ministry of Health (Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad), supported by FEDER funds.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: LS. Performed the experiments: JR-C LS. Analyzed the data: JR-C LS. Wrote the paper: LS.

References

1. Williams JG. Dictyostelium finds new roles to model. *Genetics*. 2010; 185(3):717–26. Epub 2010/07/28. 185/3/717 [pii] doi: [10.1534/genetics.110.119297](https://doi.org/10.1534/genetics.110.119297) PMID: [20660652](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20660652/).
2. Schaap P. Evolutionary crossroads in developmental biology: Dictyostelium discoideum. *Development*. 2011; 138(3):387–96. Epub 2011/01/06. 138/3/387 [pii] doi: [10.1242/dev.048934](https://doi.org/10.1242/dev.048934) PMID: [21205784](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21205784/).
3. Loomis WF. Cell signaling during development of Dictyostelium. *Dev Biol*. 2014; 391(1):1–16. Epub 2014/04/15. S0012-1606(14)00192-4 [pii] doi: [10.1016/j.ydbio.2014.04.001](https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.04.001) PMID: [24726820](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24726820/).
4. Schaap P. Evolution of developmental cyclic adenosine monophosphate signaling in the Dictyostelia from an amoebozoan stress response. *Dev Growth Differ*. 2011; 53(4):452–62. Epub 2011/05/19. doi: [10.1111/j.1440-169X.2011.01263.x](https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2011.01263.x) PMID: [21585352](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21585352/).
5. Mann SKO, Firtel RA. cAMP-dependent protein kinase differentially regulates prestalk and prespore differentiation during Dictyostelium development. *Development*. 1993; 119:135–46. PMID: [8275851](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8275851/)
6. Konijn TM, van de Meene JGC, Bonner JT, Barkley DS. The acrasin activity of adenosine-3',5'-cyclic phosphate. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1967; 58:1152–4. PMID: [4861307](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4861307/)
7. Maeda M, Lu J, Shaulsky G, Miyazaki Y, Kuwayama H, Tanaka Y, et al. Periodic signaling controlled by and oscillatory circuit that includes protein kinases ERK2 and PKA. *Science*. 2004; 304:875–8. PMID: [15131307](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15131307/)
8. Firtel RA, Chung CY. The molecular genetics of chemotaxis: sensing and responding to chemoattractant gradients. *BioEssays*. 2000; 22:603–15. PMID: [10878573](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10878573/)
9. Miranda ER, Nam EA, Kuspa A, Shaulsky G. The ABC transporter, AbcB3, mediates cAMP export in *D. discoideum* development. *Dev Biol*. 2015; 397(2):203–11. Epub 2014/12/03. S0012-1606(14)00583-1 [pii] doi: [10.1016/j.ydbio.2014.11.006](https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.11.006) PMID: [25448698](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25448698/).
10. Dormann D, Vasiev B, Weijer CJ. The control of chemotactic cell movement during Dictyostelium morphogenesis. *Phil Trans R Soc Lond B*. 2000; 355:983–91.
11. Barklis E, Lodish HF. Regulation of Dictyostelium discoideum mRNAs specific for prespore or prestalk cells. *Cell*. 1983; 32:1139–48. PMID: [6301681](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6301681/)
12. Mehdy MC, Ratner D, Firtel RA. Induction and modulation of cell-type specific gene expression in Dictyostelium. *Cell*. 1983; 32:763–71. PMID: [6299575](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6299575/)
13. van Es S, Virdy KJ, Pitt GS, Meima M, Sands TW, Devreotes PN, et al. Adenylyl cyclase G, an osmosensor controlling germination of Dictyostelium spores. *J Biol Chem*. 1996; 271:23623–5. PMID: [8798577](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8798577/)
14. Saran S, Meima ME, Alvarez-Curto E, Weening KE, Rozen DE, Schaap P. cAMP signaling in Dictyostelium. Complexity of cAMP synthesis, degradation and detection. *J Muscle Res Cell Motil*. 2002; 23(7–8):793–802. Epub 2003/09/04. PMID: [12952077](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12952077/).
15. Bader S, Kortholt A, Van Haastert PJ. Seven Dictyostelium discoideum phosphodiesterases degrade three pools of cAMP and cGMP. *Biochem J*. 2007; 402(1):153–61. Epub 2006/10/17. BJ20061153 [pii] doi: [10.1042/BJ20061153](https://doi.org/10.1042/BJ20061153) PMID: [17040207](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17040207/).
16. Kriebel PW, Parent CA. Adenylyl cyclase expression and regulation during the differentiation of Dictyostelium discoideum. *IUBMB Life*. 2004; 56(9):541–6. Epub 2004/12/14. PQ9DGH9B7W87X98 [pii] doi: [10.1080/15216540400013887](https://doi.org/10.1080/15216540400013887) PMID: [15590560](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15590560/).
17. Pitt GS, Milona N, Borleis J, Lin KC, Reed RR, Devreotes PN. Structurally distinct and stage-specific adenylyl cyclase genes play different roles in Dictyostelium development. *Cell*. 1992; 69:305–15. PMID: [1348970](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1348970/)
18. Iranfar N, Fuller D, and Loomis W.F. Genome-wide expression analyses of gene regulation during early development of Dictyostelium. *Eukaryotic Cell*. 2003; 2:664–70. PMID: [12912885](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12912885/)
19. Kim HJ, Chang WT, Meima M, Gross JD, Schaap P. A novel adenylyl cyclase detected in rapidly developing mutants of Dictyostelium. *J Biol Chem*. 1998; 273:30859–62. PMID: [9812977](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9812977/)
20. Soderbom F, Anjard C, Iranfar N, Fuller D, Loomis WF. An adenylyl cyclase that functions during late development of Dictyostelium. *Development*. 1999; 126:5463–71. PMID: [10556070](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10556070/)

21. Alvarez-Curto E, Saran S, Meima M, Zobel J, Scott C, Schaap P. cAMP production by adenylyl cyclase G induces prespore differentiation in Dictyostelium slugs. *Development*. 2007; 134(5):959–66. Epub 2007/02/03. dev.02775 [pii] doi: [10.1242/dev.02775](https://doi.org/10.1242/dev.02775) PMID: [17267449](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17267449/).
22. Ritchie AV, van Es S, Fouquet C, Schaap P. From drought sensing to developmental control: evolution of cyclic AMP signaling in social amoebas. *Mol Biol Evol*. 2008; 25(10):2109–18. Epub 2008/07/22. msn156 [pii] doi: [10.1093/molbev/msn156](https://doi.org/10.1093/molbev/msn156) PMID: [18640994](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18640994/).
23. Schaap P, Winckler T, Nelson M, Alvarez-Curto E, Elgie B, Hagiwara H, et al. Molecular phylogeny and evolution of morphology in the social amoebas. *Science*. 2006; 314(5799):661–3. Epub 2006/10/28. 314/5799/661 [pii] doi: [10.1126/science.1130670](https://doi.org/10.1126/science.1130670) PMID: [17068267](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17068267/).
24. Faure M, Franke J, Hall AL, Podgorski GJ, Kessin RH. The cyclic nucleotide phosphodiesterase gene of Dictyostelium discoideum contains 3 promoters specific for growth, aggregation, and late development. *Mol Cell Biol*. 1990; 10:1921–30. PMID: [2157967](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2157967/)
25. Louis JM, Saxe CL III, Kimmel AR. Two transmembrane signaling mechanisms control expression of the cAMP receptor gene CAR1 during Dictyostelium development. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90:5969–73. PMID: [8392183](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8392183/)
26. Galardi-Castilla M, Garciandia A, Suarez T, Sastre L. The Dictyostelium discoideum *acaA* gene is transcribed from alternative promoters during aggregation and multicellular development. *PLoS One*. 2010; 5(10):e13286. Epub 2010/10/16. doi: [10.1371/journal.pone.0013286](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013286) PMID: [20949015](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20949015/).
27. Alvarez_Curto E, Rozen D, Ritchie A, Fouquet C, Baldauf SL, Schaap P. Evolutionary origin of cAMP-based chemoattraction in the social amoebae. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102(18):6385–90. PMID: [15851658](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15851658/)
28. Pang KM, Lynes MA, Knecht DA. Variables controlling the expression level of exogenous genes in Dictyostelium. *Plasmid*. 1999; 41:187–97. PMID: [10366524](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10366524/)
29. Galardi-Castilla M, Fernandez-Aguado I, Suarez T, Sastre L. Mef2A, a homologue of animal Mef2 transcription factors, regulates cell differentiation in Dictyostelium discoideum. *BMC Dev Biol*. 2013; 13:12. Epub 2013/04/13. 1471-213X-13-12 [pii] doi: [10.1186/1471-213X-13-12](https://doi.org/10.1186/1471-213X-13-12) PMID: [23577638](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23577638/).
30. Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*. 2001; 25(4):386–401. Epub 2002/02/16. doi: [10.1006/meth.2001.1261](https://doi.org/10.1006/meth.2001.1261) S1046-2023(01)91261-7 [pii]. PMID: [11846608](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11846608/).
31. Dubin M, Nellen W. A versatile set of tagged expression vectors to monitor protein localisation and function in Dictyostelium. *Gene*. 2010; 465(1–2):1–8. Epub 2010/07/06. S0378-1119(10)00259-3 [pii] doi: [10.1016/j.gene.2010.06.010](https://doi.org/10.1016/j.gene.2010.06.010) PMID: [20600701](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20600701/).
32. Loomis WF, Shaulsky G. Developmental changes in transcriptional profiles. *Dev Growth Differ*. 2011; 53(4):567–75. Epub 2011/03/31. doi: [10.1111/j.1440-169X.2010.01241.x](https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2010.01241.x) PMID: [21447097](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21447097/).
33. Iranfar N, Fuller D, Loomis W. Transcriptional regulation of post-aggregation genes in Dictyostelium by a feed-forward loop involving GBF and lagC. *Dev Biol*. 2006; 290(2):460–9. PMID: [16386729](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16386729/)
34. Maeda M, Sakamoto H., Iranfar N., Fuller D., Maruo T., Ogiwara S., Morio T., Urushihara H., Tanaka Y., and Loomis W.F. Changing patterns of gene expression in prestalk cell subtypes of Dictyostelium recognized by in situ hybridization with genes from microarray analyses. *Eukaryotic Cell*. 2003; 2:627–37. PMID: [12796308](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12796308/)
35. Iranfar N, Fuller D, Sasik R, Hwa T, Laub M, Loomis WF. Expression patterns of cell-type-specific genes in Dictyostelium. *Mol Biol Cell*. 2001; 12:2590–600. PMID: [11553701](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11553701/)
36. Pitt GS, Brandt R, Lin KC, Devreotes PN, Schaap P. Extracellular cAMP is sufficient to restore developmental gene expression and morphogenesis in Dictyostelium cells lacking the aggregation adenylyl cyclase (ACA). *Genes Devel*. 1993; 7:2172–80. PMID: [8224844](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8224844/)
37. Chen ZH, Raffelberg S, Losi A, Schaap P, Gartner W. A cyanobacterial light activated adenylyl cyclase partially restores development of a Dictyostelium discoideum, adenylyl cyclase a null mutant. *J Biotechnol*. 2014; 191:246–9. Epub 2014/08/17. S0168-1656(14)00807-4 [pii] doi: [10.1016/j.jbiotec.2014.08.008](https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.08.008) PMID: [25128613](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25128613/).
38. Rosengarten RD, Santhanam B, Fuller D, Katoh-Kurasawa M, Loomis WF, Zupan B, et al. Leaps and lulls in the developmental transcriptome of Dictyostelium discoideum. *BMC Genomics*. 2015; 16:294. Epub 2015/04/19. doi: [10.1186/s12864-015-1491-7](https://doi.org/10.1186/s12864-015-1491-7) [pii]. PMID: [25887420](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25887420/).
39. Siol O, Dingermann T, Winckler T. The C-module DNA-binding factor mediates expression of the dictyostelium aggregation-specific adenylyl cyclase ACA. *Eukaryot Cell*. 2006; 5(4):658–64. Epub 2006/04/12. 5/4/658 [pii] doi: [10.1128/EC.5.4.658-664.2006](https://doi.org/10.1128/EC.5.4.658-664.2006) PMID: [16607013](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16607013/).
40. Verkerke-van Wijk I, Fukuzawa M, Devreotes PN, Schaap P. Adenylyl cyclase A expression is tip-specific in Dictyostelium slugs and directs StatA nuclear translocation and CudA gene expression. *Dev Biol*. 2001; 234:151–60. PMID: [11356026](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11356026/)

41. Smith E, Williams K. Evidence for tip control of the "slug/fruit" switch in slugs of *Dictyostelium discoideum*. *J Embryol Exp Morphol*. 1980; 57:233–40. PMID: [7430932](#)
42. Williams JG. Transcriptional regulation of *Dictyostelium* pattern formation. *EMBO Rep*. 2006; 7(7):694–8. PMID: [16819464](#)
43. Hopper NA, Anjard C, Reymond CD, Williams JG. Induction of terminal differentiation of *Dictyostelium* by cAMP-dependent protein kinase and opposing effects of intracellular and extracellular cAMP on stalk cell differentiation. *Development*. 1993; 119:147–54. PMID: [8565818](#)
44. Berks M, Kay RR. Cyclic AMP is an inhibitor of stalk cell differentiation in *Dictyostelium discoideum*. *Dev Biol*. 1988; 126:108–14. PMID: [2830156](#)

PUBLISHED BY

INTECH

open science | open minds

World's largest Science,
Technology & Medicine
Open Access book publisher



2800+
OPEN ACCESS BOOKS



96,000+
INTERNATIONAL
AUTHORS AND EDITORS



89+ MILLION
DOWNLOADS



BOOKS
DELIVERED TO
151 COUNTRIES

AUTHORS AMONG
TOP 1%
MOST CITED SCIENTIST



12.2%
AUTHORS AND EDITORS
FROM TOP 500 UNIVERSITIES



Selection of our books indexed in the
Book Citation Index in Web of Science™
Core Collection (BKCI)

Chapter from the book *Telomere - A Complex End of a Chromosome*

Downloaded from: <http://www.intechopen.com/books/telomere-a-complex-end-of-a-chromosome>

Interested in publishing with InTechOpen?
Contact us at book.department@intechopen.com

Molecular Diagnosis and Precision Therapeutic Approaches for Telomere Biology Disorders

Rosario Perona, Laura Iarriccio, Laura Pintado-Berninches, Javier Rodriguez-Centeno, Cristina Manguan-Garcia, Elena Garcia, Blanca Lopez-Ayllón and Leandro Sastre

Additional information is available at the end of the chapter

<http://dx.doi.org/10.5772/65353>

Abstract

Telomeres are nucleo-protein structures located at the end of chromosomes that protect them from degradation. Telomeres length is maintained by the activity of the telomerase complex. These structures are protected by a specialized protein complex named shelterin. In the absence of telomerase activity and/or protection telomeres are shortened after each round of DNA replication. When a critical size is reached, telomeres are recognized as damaged DNA by the cell p53-dependent DNA-repair system. Persistent activation of this pathway finally results in cell apoptosis or senescence.

There are a number of rare hereditary diseases caused by the presence of shortened telomeres, collectively named telomeropathies or telomere biology disorders. In these diseases, cell proliferation is impaired, which results in premature aging and dysfunction of highly proliferative tissues (bone marrow, skin and other epithelia). Among them are Dyskeratosis congenita, the Hoyer-aal-Hreidarsson, Revesz and Coats plus syndromes, Aplastic anemia, Idiopathic pulmonary fibrosis and nonalcoholic, noninfectious liver disease. Mutations present in the genes coding for component of the telomerase and shelterin complexes and other proteins involved in telomere replication are the cause of these diseases. Clinical manifestations, causative mutations, diagnosis and possible therapeutic approaches to these diseases will be discussed in this chapter.

Keywords: telomere, telomere biology disorders, telomeropathies, pulmonary fibrosis, bone marrow failure

1. Introduction

Eukaryotic chromosomes are capped at their ends by specialized nucleo-protein structures, named telomeres that protect them from degradation. Human telomeres have a specific nucleotide sequence composed by thousand of repetitions of the TTAGGG hexanucleotide [1]. A protein complex, named shelterin associates to this DNA region to form the telomere-specific chromatin structure. Telomeres protects the chromosomal ends from degradation and are, therefore, essential for chromosomal and genome stability [2]. In their absence chromosomal ends are recognized as damaged DNA by the cell and can be degraded or recombined with other chromosomal ends resulting in the fusion and reorganization of chromosomes [3]. The maintenance of telomeres is, therefore, of critical importance for the genetic stability of cells and organisms.

Replication of telomeric DNA requires the contribution of a specific enzymatic machinery. DNA polymerases responsible for replication of the rest of the chromosomal DNA cannot completely synthesize telomeric DNA. DNA polymerases always require a primer molecule that cover the 5' end of the DNA and are not able to complete the synthesis of the lagging strand of lineal DNA molecules, such as chromosomes. This end-replication problem results in the shortening of each telomere by 50-100 nucleotides at each DNA replication cycle and, therefore, at each cell division [4]. In most eukaryotic organisms, including humans, telomere length is maintained by the activity of the telomerase complex that elongates the telomeres by a replication-independent mechanism [5]. The complex is formed by a protein with reverse-transcriptase activity (TERT) and one RNA with a region of homology to the telomere DNA that is used as template for elongation [6]. Telomerase activity is, therefore, required for unlimited cell proliferation. Telomerase components and, in particular the TERT gene, are expressed to high relative levels during embryonic development allowing high cell proliferation rates. Expression of the TERT gene is, however, repressed in most human adult cells [7]. TERT expression is found only in germinal cells, in stem cells, specially in those of highly proliferative tissues such as bone marrow and epithelia and in lymphocytes [8]. The rest of the cells express very low TERT levels and their telomeres get progressively shorter after each cell division. When telomeres reach a critical size get unprotected and are recognized as damaged DNA. The ATM and ATR kinases, that regulate cellular responses to DNA damage are recruited to critically-short telomeres and activate the p53-dependent pathway that results in cell cycle arrest [3]. Prolonged arrest would finally induce apoptotic cell death or cellular senescence. Actually, most tissue-specific stem cells do not express enough TERT protein to completely replicate their telomeres at each cell division and their proliferative capacity decreases with the age of the organism [9]. With time, stem cell exhaustion impairs tissue renewal. Because of this reason, telomere shortening has been recognized as one of the hallmarks of human aging [10].

Telomere replication is also involved in the acquisition of the unlimited proliferative capacity that characterizes tumor cells [7]. Telomerase expression and activity is induced in about 85% of tumors, which allows tumor cells to completely elongate their telomeres at each cell division. In the other about 15% of tumors, telomeres length is maintained by a telomerase-independent

mechanism, known as Alternative Lengthening of the Telomeres (ALT) that elongates telomeres through DNA recombination mechanisms [11].

The importance of telomere homeostasis is further enforced by the existence of a number of rare hereditary diseases that are caused by the presence of shortened telomeres, collectively named telomeropathies, short telomere syndromes or telomere biology disorders [12]. These diseases are caused by mutations in genes coding for proteins involved in telomere lengthening (telomerase complex and related proteins) or in the maintenance of telomere structure (shelterin complex). These diseases are commonly characterized by the presence of very short telomeres in the cells of the affected patients. The molecular pathology of these diseases, their diagnosis and emerging therapies will be summarized in this chapter. It is necessary to enforce the importance of telomere homeostasis for healthy life since excessively long telomeres are also causative of disease. Recent reports have associated the presence of long telomeres to increased frequency of cancers such as melanoma or glioma [13]. Mutations in the promoter region of the TERT gene that increase gene expression are frequently found in these and other tumors [14, 15]. In addition, mutations in the coding region of genes coding for protein of the shelterin complex have been found in human tumors [16, 17].

2. Main body

2.1. Telomere structure

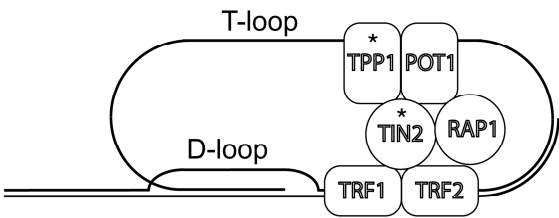
Telomeres have a very specialized chromatin structure that is required to protect chromosome ends from degradation and to avoid telomere-telomere fusions [2]. The general structure will be briefly summarized in this section of the chapter and is schematically shown in the upper panel of Figure 1 where the genes mutated in telomere biology disorders are indicated by asterisks. Telomere structure has been the subject of several recent excellent reviews [2, 12, 18, 19]. The nucleotide sequence of telomeres is composed for multiple repetitions of the TTAGGG hexanucleotide in humans and several other animals. The length of these regions is variable in different organisms. In humans, telomeres have an average size of 8-14 kb in peripheral blood cells in newborn children [20]. The size decreases with age so that the average size in a 90-years old person is of 3-7 kb [12]. In contrast, most mice strains used in research have an average telomere length of 50-100 kb which has made more difficult the development of mouse models of telomere biology disorders [21, 22].

Telomere ends are not formed by blunt-ended double-stranded DNA, as might be expected. Instead, the 3' strand is about 75-300 bases longer than the 5' end strand forming an overhanging single-stranded DNA fragment (Fig 1, upper panel) [1]. The overhanging strand contains the TTAGGG sequence and is, therefore, known as the G-rich strand. The complementary strand contains the complementary CCCTAA repeats and is named the C-rich strand. The overhanging strand is not unstructured. Instead, it turns over the telomere DNA and intercalates in the neighbouring double-stranded DNA forming a loop, named the T-loop, as schematically shown in the upper panel of Figure 1 [23]. Looping results in the formation of a

triple stranded DNA region known as D-loop that is required for the stability of the terminal telomeric DNA region [24].

Telomeres are further stabilized by the presence of a specific protein complex, the shelterin complex. It is composed by six different proteins: TRF1, TRF2, RAP1, TIN2, TPP1 and POT1 (upper panel of Figure 1) [2]. TRF1 (telomeric repeat binding factor 1, encoded by the TERF1 gene) binds to telomeric double-stranded DNA as a dimer [25]. TRF2 (telomeric repeat binding factor 2, encoded by the TERF2 gene) also binds double-stranded DNA as a dimer and associates with TRF1 [26]. The TIN2 protein (TRF1-interacting protein 2) interacts with TRF1 and TRF2 [27] and recruits the POT1(Protection of telomeres protein 1)/TPP1(POT1-interacting protein 1) heterodimer [28]. POT1 binds with high affinity to the G-rich strand overhang [29]. RAP1 (repressor-activator protein 1) incorporates to the shelterin complex via TRF2 interaction [28]. In addition, telomeres and subtelomeric regions are enriched in heterochromatin components including the association of HP1 proteins and histone 3 Lysine 9 and histone 4 lysine 20 trimethylation which further contributes to their stability [30].

A Telomeres structure



B Telomeres elongation

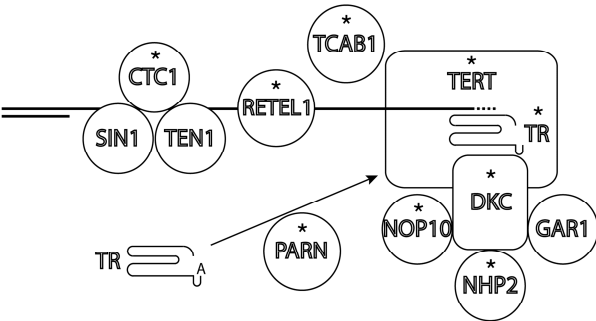


Figure 1. Telomere structure and elongation mechanism.

The shelterin complex is required for telomere maintenance and function and prevents the recognition of telomeres as damaged DNA. TRF2 inhibits the ATM kinase that induces the

canonical non-homologous-end-joining DNA repair pathway that would result in telomere-telomere fusions [31]. In addition, POT1 inhibits signalling by the ATR kinase in response to DNA damage by double-strand and single-strand breaks and alkylating agents [32]. POT1 also inhibits sister-telomere associations [33].

Telomere structure is schematically shown in upper panel A of the figure. Telomeric DNA is formed by repetitions of the TTAGGG hexanucleotide and is represented as two lines in the figure. The upper line represents the leading, G-rich strand. The 3' end of this strand is single-stranded and forms a loop (T-loop) to hybridize to a region of the upstream double-stranded DNA forming a smaller loop (D-loop). The lower line represents the lagging DNA strand. Proteins of the shelterin complex, which binds to telomeric DNA, are represented as boxes. Asterisks indicate the proteins whose encoding gene have been found mutated in patients with telomere biology disorders. Panel B represent the components involved in telomere elongation. DNA is represented as two lines and proteins as boxes, as indicated on panel A. The DNA leading strand is the upper one and the DNA being synthesized is represented as a broken line. The components of the telomerase complex that catalyzes telomere elongation are represented on the right of the panel. Telomerase complex is composed by the TERT, DKC, NOP10, NHP2 and GAR1 proteins and the RNA molecule TR. The protein TCAB1 is required for telomerase recruitment to telomeres. PARN is required for TR RNA processing. The RETEL1 helicase and the CTC1/SIN1/TEN1 complex facilitate telomere elongation by disrupting DNA secondary structures. Asterisks indicate the proteins whose encoding genes have been found mutated in patients with telomere biology disorders.

2.2. Telomere elongation

In this section a brief summary of the telomere elongation process and its regulation will be presented because many of the proteins involved are related to telomere biology disorders. A schematic representation of the process is shown at the lower panel of Figure 1. Genes mutated in telomere biology disorders, as described in next sections, are indicated by asterisks. Telomere replication has been reviewed recently by several authors [18, 19, 34-36]. Cellular DNA polymerases cannot complete the replication of DNA double-strand ends which is known as the end-replication problem [37], as mentioned in the Introduction section. In mammals, telomere DNA 3' ends are elongated by the telomerase complex through reverse transcription. The catalytic activity of the complex resides in the TERT (telomerase reverse transcriptase) protein [6] while the 454 nucleotides long TR (telomerase RNA, encoded by the TERC gene) is used as template [38] (Figure 1, lower panel) [36]. This is because TR has an internal region complementary to the TTAGGG repeats that allows hybridization to the 3' end of the telomere DNA [36]. The TR RNA has similarity to other small nucleolar RNAs and contains a H/ACA motif [39]. It is transcribed by RNA polymerase II and contains a Cap structure and its 5' end and a 3' oligo-Adenosine tail [40]. It has been recently shown that the 3' end of TR has to be processed through exonuclease cleavage and that the Poly(A)-specific ribonuclease (PARN) is required for this maturation process [41].

Additional proteins form part of the telomerase complex and are required for its assembly and stability. Among them, dyskerin (encoded by the DKC1 gene) binds to TR through its inter-

action with the dyskerin PUA RNA binding domain [42]. Dyskerin binding is required for TR stability and for its recruitment to the telomerase complex. The proteins NHP2 and NOP10 associate to dyskerin and are also required for telomerase assembly [43].

Telomerase activity is dependent on TERT gene expression that is tissue-dependent and developmentally regulated, as mentioned in the Introduction section. In addition, it is dependent on protein-protein interactions that regulate telomerase-complex assembly and its recruitment to telomeres. One of the proteins involved is TCAB1 (encoded by the WRAP53 gene) that is an essential component of the subnuclear Cajal body structures. TCAB1 associates to TR, contributing to telomerase assembly in these structures [44]. Depletion of TCAB1 results in a relocation of the telomerase complex to the nucleolus and reduced recruitment to telomeres [44]. The shelterin-complex component TPP1 is also required for the recruitment of telomerase to telomeres. The TEL patch of TPP1, rich in Glutamate and Leucine residues, interacts with the TEN domain of TERT to mediate telomerase recruitment [45]. This interaction also promotes the telomerase ability to catalyze repeated cycles of DNA synthesis at the telomeres [46].

After elongation of the G-rich overhanging strand by the telomerase complex the C-rich strand is synthesized by the activity of the primase/DNA polymerase complex [35]. Proteins with helicase activity are required to facilitate telomere elongation through disruption of DNA structures that impair telomerase and DNA polymerase activity. The G-rich nature of the overhanging strand favours the formation of secondary structures such as G-quartets [47]. In addition, the D-loop structure of telomeres can also impair DNA synthesis. One of the proteins involved in solving DNA structures at the telomeres is RETEL1 (regulator of telomere length 1), a DNA helicase with D-loop-disrupting activity that has been proposed to facilitate T loop unwinding and to counteract the formation of G-quartets [48, 49]. In addition, RETEL1 has additional functions at other DNA loci [50]. The CST complex, formed by the CTC1, STN1 and TEN1 proteins promotes the initiation of the lagging C-rich strand synthesis [51]. CTC1 binds to the single-stranded G-rich DNA strand and recruits the initiator Pol α primase complex to accomplish C-rich strand synthesis [52].

Once DNA synthesis is completed at telomeres, DNA is further processed to generate the G-strand overhangs [35]. This is a highly regulated process so that G-strands overhangs are between 30 and 400 nucleotides long and the C-rich strand ends at the 3'-CCAATC-5' sequence in most telomeres [53]. Processing requires the activity of several factors: the Apollo/SNMB1 nuclease, Exonuclease I, the CST complex and two shelterin proteins, POT1 and TRF2 [54].

It is important to enforce that although telomere structure and replication have been presented separately for simplicity they are highly interconnected processes. For example, proteins of the shelterin complex play essential roles in telomere elongation through recruitment of the telomerase complex and proteins involved in the regulation of telomere length.

2.3. Telomere biology disorders

Several diseases related to telomere biology will be described in this section. The clinical manifestations of each disease will be described together with their molecular bases. These

diseases are multisystem genetic disorders that share many of the affected genes (see [12, 13, 18, 19, 55-58] for recent reviews). They also have in common the presence of very short telomeres in the affected patients. However, time of onset, phenotype and clinical severity of these diseases are very heterogeneous. Some of the disorders manifest in young children as it is the case of Dyskeratosis congenita, Hoyeraal-Hreidarsson syndrome, Revesz syndrome and Coats plus syndrome that are rare diseases presented with very low frequency in the population. Other diseases that manifest at older ages, generally in adults, are less severe and more frequent in the population. Among these are Aplastic anemia, Lung disease and Non-alcoholic, non-infectious liver disease. A summary of these diseases, their clinical manifestations, time of presentation and the genes that have been found mutated is shown in Table 1.

Disease	Symptoms	Presentation time	Mutated genes (inheritance)*
Dyskeratosis congenita	Nail dysplasia	Childhood	DKC1 (XL)
	Abnormal skin pigmentation		TERT (AD,AR)
	Oral leukoplakia		TERC (AD)
	Bone marrow failure		TINF2 (AD)
	Pulmonary fibrosis		WRAP53 (AR)
	Liver abnormalities		NOP10 (AR)
	Avascular necrosis of the hips		NHP2 (AR)
	Stenosis of the exophagus, lacrimal ducts and/or uretra		CTC1 (AR)
	Increased cancer risk		RTEL1 (AD,AR)
	Osteopenia, risk of bone fractures		PARN (AR)
Hoyeraal-Hreidarsson syndrome	Psychiatric disorders	Early childhood	
	Intrauterine growth retardation		DKC1 (XL)
	Microcephaly		TINF2 (AD)
	Cerebellar hypoplasia		TERT (AR)
	Thrombocytopenia		RTEL1 (AR)
	Immunodeficiency		TPP1 (AR)
Revesz syndrome	Nonspecific enteropathies	Early childhood	PARN (AR)
	Bone marrow failure		
	Bilateral exudative retinopathy		TINF2 (AD)
	Bone marrow failure		
	Intrauterine growth retardation		
	Intracranial calcifications		

Disease	Symptoms	Presentation time	Mutated genes (inheritance)*
Coats plus syndrome	Developmental delay	Early childhood	CTC1 (AR)
	Fine, sparse hair		
	Nail dystrophy		
	Bilateral exudative retinopathy		
	Retinal telangiectasias		
Aplastic anemia	Intrauterine growth retardation	Middle age	TERT (AD)
	Bone abnormalities with poor healing		
	Gastrointestinal vascular ectasias		
	Bone marrow failure		
Idiopathic pulmonary fibrosis	Pulmonary fibrosis	Middle age	TERT (AD)
	Emphysema		
	Interstitial pneumonitis		
	Honeycombing in high resolution computarized tomography		
Nonalcoholic, noninfectious liver disease	Hepatic fibrosis	Middle age	TERT (AD)
	Noncirrhotic portal hypertension		
	Hepatopulmonary syndrome		

*XL: X-linked; AD: autosomal dominant; AR: Autosomal recessive

Table 1. Clinical characteristics of telomere biology disorders.

2.3.1. Dyskeratosis congenita

Dyskeratosis congenita (DC) was the first telomere biology disease described in early 1900s [59]. It is an inherited disorder that is usually diagnosed in early childhood. The most characteristic clinical feature is a triad of mucocutaneous features: leukoplakia, reticulated skin pigmentation and nail dystrophy, as shown in Table 1. Lacy reticular pigmentation use to be observed at neck and upper chest. However, DC symptoms have variable expressivity and/or incomplete penetrance and this triad is not always present. Some patients worsen with age and the triad might not be evident in the firsts examinations. The median age of appearance of the triad is approximately 8 years [59]. The variability in the nail phenotype can go from ridging to complete nail loss and can involve both the finger and toenails. The skin may be hyper or hypo pigmented. Leukoplakia may affect other mucosa surfaces. However, additional

reports expanded the phenotype and it is now recognized as a multisystem disease. One of the most common haematological manifestations is bone marrow failure that is the most significant cause of mortality in DC patients, up to 60-70% [60]. Patients present hypocellular bone marrow and severe cytopenias.

DC patients frequently show other skin manifestations, some of them are atrophy of the dorsal surface of hands and feet, hyperhidrosis and hyperkeratosis of palms and soles. Other mucosal surfaces can also be affected leading to stenosis of the oesophagus, urethra or lacrimal duct. Oesophageal strictures and non-specific enteropathies are common. Dental abnormalities can be also observed including extensive caries in 13-17% of the patients [61]. Early greying and loss of hair also occur. Skeletal abnormalities are also observed in up to 5% of the patients [62] including osteoporosis and avascular necrosis. Osteoporosis resembles that seen in natural aging and can lead to fractures [63].

Respiratory abnormalities are also a significant cause of morbidity and mortality and cause the death of 10-15% of DC patients [64]. The main clinical manifestation is pulmonary fibrosis that usually is posterior to the mucocutaneous or bone marrow features. Hepatic disease can be also observed including cirrhosis, fibrosis, portal hypertension and portal vein thrombosis and several cases of non-alcoholic, non-infectious liver diseases have been reported [65].

Neuropsychiatric disorders were recently described in 55% of children and 75% of adult DC patients [66]. These disorders include mood, anxiety, psychotic and adjustment disorders, attention deficit/hyperactivity, intellectual disability, learning disabilities and pervasive developmental disorders.

DC patients also present increased risk of cancer development. Co-occurrence of Myelodysplastic syndrome (MDS), Acute myelogenous leukemia (AML) and head and neck squamous cell cancer has been described. A literature review reported a 11-fold increased risk of cancer in DC patients including AML, MDS, tongue cancer, cervical squamous cell carcinoma and non-Hodgkin's lymphoma, with a risk of 40% of developing any cancer by the age of 50 [67].

This diversity in clinical manifestations makes the diagnosis of DC challenging. When the mucocutaneous triad is observed the diagnosis is relatively clear but this is not always the case. Vulliamy et al proposed in 2006 clinical criteria for the diagnosis of DC [68]. These criteria require the presence of the three components of the mucocutaneous triad or one feature of the triad, bone marrow failure and two other clinical manifestations usually found in DC patients, as described above. However, the diagnosis of some patients can still be difficult because the triad might evolve late in time and other clinical manifestations might not be associated to DC because of their diversity.

2.3.1.1. Dyskeratosis congenita as a telomere biology disease, implications in diagnosis

Dyskeratosis congenita may have X-linked inheritance which allowed the identification of one X-chromosome gene that presented missense mutations in several unrelated DC patient. The encoded protein was named dyskerin and the gene DKC1 [60, 69]. Dyskerin was characterized as a highly conserved protein with possible nucleolar functions [60]. Soon afterwards, fibroblasts derived from DC patients were shown to have very short telomeres [70]. These cells

also presented reduced telomerase activity and decreased levels of TERC expression. The correlation between Dyskeratosis and telomere length was strengthened when a large family was found carrying an autosomal dominant mutation in the TERC gene [71].

The recognition of DC as a telomere biology disease helped to understand the biology of this disease. As mentioned in the Introduction, critically short telomeres are recognized as damaged DNA by DNA-damage response pathways that involve the ATM and ATR protein kinases and the p53 protein. Activation of these pathways induces apoptotic cell death and cellular senescence. Telomere shortening is associated to DNA replication, which is specially relevant in cells that have impaired systems of telomere elongation and protection, as is the case of DC patients cells. Therefore, highly proliferative cells are expected to be the firstly affected by telomere shortening. Some of these highly proliferative cells are the stem cells of tissues with high capacity of renewal such epithelia, bone marrow cells and lymphocytes. These cells types are characterized by the expression of high telomerase activity in healthy individuals. Depletion of these stem cell populations can explain the main clinical manifestations of DC patients. Among them are the deficit observed in epithelial tissues such as different mucosa and skin that could be due to insufficient cell renewal because of exhaustion of stem cell populations. Impaired proliferation of bone marrow stem cells also could explain the existence of hypocellular bone marrow and severe cytopenia. Pulmonary alveolar stem cell failure has also been recently described in patients with telomere dysfunction [72]. The reduction in the number and proliferative capacity of stem cells can also explain the premature aging of DC patients as manifested by hair loss and early greying. These data would recognize DC as a stem cell disease.

A second clinical characteristic associated to progressive telomere shortening is the existence of genetic anticipation. It is defined by the occurrence of increasing disease severity and early onset with successive generations, as observed in multigenerational families with autosomal dominant DC [73-75]. Genetic anticipation is due, in these diseases, to non-complete telomere replication in germinal cells due to impaired telomerase activity. Successive generations inherit progressively short telomeres and, therefore, critically short telomeres appear at an early age in highly proliferative tissues of the affected patients.

The identification of telomere shortening also provides one important diagnostic criteria. DC patients are characterized by the presence of very short telomeres in peripheral blood cells. Usually below the 1% of the telomere size of control populations of the same age as the patient. Measuring telomere length provides one differential diagnostic criteria for telomere biology diseases. The length of telomeres can be determined by different methods in patient samples [76] and compared with controls of the same age. Variation of telomere length with ethnicity has also been described [77]. One of the methods estimates telomere length by Southern blot. Purified DNA is digested with a restriction enzyme that has recognition sites close to the telomeres (sub-telomeric region) but not at the telomere. Digestion products are separated in agarose gels and blotted to membranes that are hybridized to telomere-specific probes. The distribution of telomeres size and average length can be determined by comparison to the migration of DNA molecular weight markers. The use of this technique requires relatively high amounts of pure DNA.

Telomere length can also be determined by quantitative PCR methods from clinical samples. Some of these methods use telomere-specific oligonucleotides to determine the amount of telomeric DNA in comparison to non-telomeric DNA in each sample. This method has the advantage that a large number of samples can be easily analyzed but it gives an average length of all the cellular telomeres. However, variation in the length of individual chromosomes can be also important in disease progression [78]. Telomeres rearrangements can also have a large effect on the cell [79] and would not be detected by measuring average telomeric DNA content. A PCR-based method that determines single telomere length (Single telomere length assay, STELA) has also been developed [80]. Telomere length can also be determined by flow fluorescence in situ hybridization (flow-FISH) using peripheral blood lymphocytes [81]. This technique can be used in clinical settings and has been shown to be highly sensitive and specific in identifying patients with DC from their unaffected relatives and healthy controls [81, 82]. Flow-FISH is presently the only clinically certified test for DC.

2.3.1.2. *Molecular genetics of Dyskeratosis congenita*

DC is a rare inherited disease caused by mutations in genes coding for proteins involved in telomere synthesis and protection. Mutations in ten genes have been identified to date in DC patients [55]. Mutations in these genes explain about 60% of the cases of DC so that there are many cases where the causative gene has not been identified. Until few years ago, molecular diagnosis was made through PCR amplification and DNA sequencing of each exon of the candidate genes, pre-analyzed by High Resolution Melting [83]. Discovery of new genes involved in DC and related telomeropathies required positional cloning and were challenging projects. The development of techniques of massive parallel DNA sequencing makes now possible to sequence either all the genes of a patient (genome sequencing) or all the gene exons (exome sequencing) [84]. Analyses of massive sequencing data greatly facilitates molecular diagnosis as well as the discovery of genes whose causative relationship with the disease was previously unknown. One example is the recent identification of mutations in the PARN gene, coding for a Poly(A)-specific ribonuclease in DC patients [85]. The genetic mutations found in DC patients will be reviewed in this section of the chapter and have been described in recent reviews [18, 86]. A summary is also presented in Table 1. Detailed updated information on the nucleotide variants found in DC-related genes can also be found at the Telomerase Database (<http://telomerase.asu.edu/diseases.html>).

2.3.1.2.1 Dyskerin (DKC1)

Dyskerin is a 524 amino acids long protein that is highly conserved during evolution. It is an essential nucleolar protein that is expressed in all tissues [42]. Dyskerin participates in two very relevant cellular activities, telomere maintenance and RNA pseudouridylation. The first activity has been described in the Telomere elongation section of this chapter (section 2.2). For the second activity dyskerin binds to small nucleolar RNAs containing the H/ACA box to form small nucleolar RNP (snoRNP) complexes. The proteins NHP2, NOP10 and GAR1, involved in telomerase assembly are also part of these complexes [42]. Small nucleolar RNAs guide snoRNPs to specific uridine residues that are converted to pseudouridines by dyskerin. Pseudouridylation takes place in many cellular RNAs including ribosomal RNAs but also

small nuclear and nucleolar RNAs and mRNAs, as recently described [87]. This modification is important for folding and processing of these RNAs [88]. One subset of snoRNPs (Cajal body RNPs, scaRNPs) is directed to Cajal bodies by the TCAB1 protein [89]. The telomerase RNA, TR, assembles as a typical scaRNP, which is important for TR stability and telomerase recruitment [39, 70] as previously indicated (section 2.1). Because of this pseudouridylation activity of rRNAs, dyskerin is important for ribosome biogenesis and function, and dyskerin mutations could impair protein synthesis. However, human cells obtained from X-linked DC patients showed intact or only slightly affected ribosome biogenesis and function and very reduced TR levels [90, 91]. These data support the hypothesis that impaired TR stability and telomerase activity are the main cause of DC. However, Bellodi et al. have reported that impaired protein synthesis could contribute to the cancer predisposition of DC patients [92].

Sequence analyses in the Pfam databank identified three functional domains in dyskerin: the dyskerin-like domain (amino acids 48-106] with a yet unknown function; the TruB pseudouridine synthase catalytic domain (aa 110-126], and the PUA RNA binding domain (aa 297-370]. To date, over 50 different DKC1 mutations have been found in association with DC. Many of them were inherited but there were some that were generated de novo in the patients. Not all these mutations show the same severe phenotype and 13 of them cause the Hoyeraal-Hreidarsson syndrome, a more severe manifestation that will be described in the section 2.3.2 of this chapter. Two of the DKC1 mutations are only found in this syndrome. Most DKC1 mutations cluster in two regions of the gene: the region coding amino acids 2-72, at the N-terminus of the protein, and the region coding amino acids 314-420, at the PUA domain [68, 86]. These two domains are contiguous in the three-dimensional structure of the protein and might form a binding site for other proteins [93]. Some disease-causing mutations have been shown to alter dyskerin-TR binding because they affect binding of the RNP assembly factor SHQ1 [94]. N-terminal DKC1 mutations overlap a SUMOylation motif and Brault et al have shown that impaired SUMOylation leads to reduced dyskerin, and TR, levels [95]. A mutation in the promoter region of DKC1 that affected dyskerin expression was also identified in a DC patient [96] suggesting that protein levels could have an important role in DC pathogenesis. DKC1 is encoded in the X-chromosome and dyskerin mutations have X-linked transmission with affected males and carrier mothers. In most of the cases carriers do not show any clinical manifestation but carriers of some mutations can manifest late onset diseases such as pulmonary fibrosis that will be described in section 2.3.6.

2.3.1.2.2 Telomerase Reverse Transcriptase (TERT)

The catalytic protein component of the telomerase complex is one 1132 amino acid long protein that contains three major functional domains conserved through evolution [97]. The telomerase essential N-terminal (TEN) domain is highly conserved among vertebrate proteins and has been implicated in telomere DNA binding upstream of the primer-template interaction [98]. The TEN domain contains a DAT motif involved in telomerase recruitment to the telomeres through interaction with the TEL patch of TPP1 shelterin component. The TERT RNA-binding domain (TRBD) is located next to the TEN domain and precedes the reverse transcriptase domain, which contains the active site for reverse

transcription. In addition, the reverse transcriptase motif also participates in TR RNA binding ensuring the maintenance of a stable telomerase complex [99]. Finally, TERT contains a less-conserved C-terminal extension region.

Comparative analysis of the TERT gene in healthy individuals and telomere biology disorder patients has shown a high degree of nucleotide variation. More than 200 distinct missense nucleotide variants are described in the TERT gene at the Exome Aggregation Consortium (ExAC) database (<http://exac.broadinstitute.org/>). This database compiles all the nucleotides variants found in the different Exome sequencing projects and presently accumulates information from about 60.700 individuals [121.400 alleles for each gene). Data from both healthy individuals and patients from different diseases are incorporated to this database. Over 75 TERT mutations, most of them novel, have been reported in telomere biology disorders diseases [100], including missense, stop gain, frameshift and splice site mutations. However, the existence of a given mutation in a patient does not imply that it is causative of the disease. It might be a mutation that does not affect protein functionality. The existence of a familiar history showing a strong correlation between the presence of the mutation and disease manifestation would support the causative role of this mutation. However, if it is a novel mutation, or the family history is short, experimental assay of the activity of the mutated protein is required to ascertain the possible causal role. For this purpose, mutated TERT proteins are expressed in cells that have very low telomerase activity, if any. The activity of the mutated protein can be consequently tested on this background using the telomere repeat amplification protocol (TRAP) or primer extension assays (see Collopy et al [101] for a recent example).

TERT mutations associated with DC and other telomere biology disorders are found all over the protein although their frequency is higher at the reverse transcriptase domain. Most reported patients with TERT mutations are monoallelic heterozygous. The telomerase activity found in cells from these patients is an average of homozygous wild type and mutant cells and might indicate that haploinsufficiency is the cause of the clinical phenotype [74, 102, 103].

2.3.1.2.3 Telomerase RNA, TR (TERC)

The RNA component of the telomerase complex is 454 nucleotides in length and is encoded by the TERC gene. This RNA provides the template sequence for reverse transcription and is involved in assemblage of the RNP complex [104]. The interaction between TR and TERT regulates the catalytic activity, processivity and telomere-binding activity of the telomerase complex [105]. TR presents domains conserved through evolution that are involved in RNA stabilization, accumulation, subcellular localization and telomerase assembly. They are the template/pseudoknot domain and the CR4/5 motif [106]. These two domains are sufficient to restore telomerase activity when combined with TERT [107, 108]. An additional H/ACA domain at the 3' end of TR allows binding of the proteins required for telomerase biogenesis dyskerin, NOP10, NHP2 and GAR1 [43].

Mutations in TERC are less frequent than in TERT in DC patients and approximately 60 different mutations have been reported [100]. Nucleotide variants are also less frequent in the general population and only 62 are reported in ExAC exomes database. Among the mutations

found in DC patients some deleted large segments that affect functional domains while others are nucleotide substitutions. Mutations are particularly frequent at the pseudoknot domains and present an autosomal dominant inheritance (<http://telomerase.asu.edu/diseases.html>). As indicated for TERT, the functional significance of TERC mutations, specially nucleotide substitutions, has to be determined experimentally. A relevant example determined functional properties such as TR stability, TERT interaction, telomerase activity and processivity of 13 TR mutations [109].

2.3.1.2.4 TERF1- interacting nuclear factor 2 (TINF2)

The gene TINF2 codes for the protein TIN2, component of the shelterin complex that protect the telomere and regulates telomerase recruitment and activity. TIN2 links the double-stranded DNA binding proteins TRF1 and TRF2 to the single-stranded DNA binding proteins TPP-1 and POT1 within the shelterin complex. TIN2 also interacts with heterochromatin protein 1 gamma (HP1 γ) [110] through the canonical PTVML binding site [111] which is crucial for sister telomere cohesion.

Over 20 mutations in TINF2 have been described in DC patients. Many of them are novel mutations and results in early-onset disease. Familiar mutations are usually inherited in autosomal-dominant manner [111, 112]. All TINF2 mutations reported to date cluster in a segment coding for 34 amino acids centrally located in the gene. The function of this short protein fragment is not clear at the present time. One of the functions affected in some TINF2 mutants is HP1 γ binding [110] which could be explained because the PTVML binding site is located within the mutation cluster [111]. Impaired HP1 γ binding resulted in reduced sister telomere cohesion. On the contrary, the interaction of TIN2 with TERF1 is not affected in most of the mutated proteins [112, 113]. Impairment of telomerase recruitment to telomeres in a TIN2 mutant has been reported [114]. However, the telomere shortening observed in a mouse model of TINF2 mutation was recently reported to be telomerase independent [115].

2.3.1.2.5 TCAB1: Driving telomerase to Cajal bodies (WRAP53)

The protein TCAB1 (encoded by the WRAP53 gene) [116] binds to the telomerase RNA, TR, through the 4 nucleotides CAB box, present on small Cajal body-associated RNAs. Telomerase recruitment to Cajal Bodies is required for consequent assembly on the telomeres [44, 117].

Compound heterozygous mutations in WRAP53 have been identified in DC patients [118]. Telomerase localization to Cajal Bodies was disrupted in this patients leading to TR accumulation in the nucleoli. Mutations map to a region that mediates interaction between TCAB1 and the TCP-1 Ring Complex (TRiC) that is required for TCAB1 folding.

2.3.1.2.6 Nucleolar protein 10 (NOP10, Nola3)

Nucleolar protein 10 (NOP10) is encoded by the Nola3 gene (nucleolar protein family A, member 3). This protein is a H/ACA snoRNA-binding protein that binds the TR RNA in association with dyskerin and NHP2 [43]. One homozygous mutation has been found in a DC patient that impaired TR binding and RNP assembly [119].

2.3.1.2.7 NHP2 ribonucleoprotein (Nola 2)

Similarly to NOP10, the NHP2 protein, encoded by the NHP2 gene, also named Nola2, is a H/ACA snoRNA-binding protein that associates to TR together with dyskerin [43]. One homozygous missense mutation in the NHP2 gene was described in a patient with severe DC while compound heterozygous mutations were described in a second DC patient [120]. These patients had decreased TR levels and short telomeres because of impaired telomerase assembly and stability [119].

2.3.1.2.8 Conserved telomere maintenance component 1 (CTC1)

The protein CTC1 is one of the components of the CST complex (CTC1, STN1, TEN1) that promotes re-start of the telomere lagging strand synthesis and fill-in C-rich strand synthesis at the telomeres [51, 52]. CTC1 binds to single-stranded DNA at telomeres and associates with the replication initiator pol α primase complex.

Biallelic, compound heterozygous, CTC1 mutations were identified in a group of DC patients [121, 122]. These mutations impaired the association of CSC1 with STN1, TEN1 and pol α primase, telomeric DNA binding and cellular localization [123]. To date, 10 CTC1 mutations have been associated with DC patients [122].

2.3.1.2.9 Regulator of telomere elongation helicase 1 (RTEL1)

Regulator of telomere elongation helicase 1 is an essential DNA helicase that belongs to a small family of these proteins involved in different genomic instability diseases [124]. At telomeres, RTEL1 disrupts the D-loops resolving the T-loop structure [48]. RTEL1 is recruited to telomeres by TRF2 in late S phase and is essential to prevent nuclease-dependent excision of telomere T-circles [49]. RTEL1 also show G-quartet unwinding activity required for telomeric DNA replication although this activity is independent of TRF2 [50]. In addition, RTEL1 has important non-telomeric functions in processes such as DNA-replication, DNA repair and homologous recombination [125].

Whole-exome sequencing in DC patients and their families identified RTEL1 mutations that could cause DC and related telomere biology disease such as the Hoyeraal-Hreidarsson syndrome and Pulmonary Fibrosis, that will be described later (sections 2.3.2 and 2.3.6) [126-128]. To date almost 30 RTEL1 variants have been reported in telomere biology diseases patients. Most RTEL1 mutations are transmitted in autosomal recessive manner but autosomal dominance has been also reported [126]. Some mutations map to functional protein domains such as the helicase, harmonin homology or the C4C4 metal-binding motifs [129]. The RTEL1 R1264H mutation, that impairs RTEL1 interaction with TRF2, has been found in 1% of the Ashkenazi Jewish population [130].

2.3.1.2.10 Poly(A)-specific 3' exoribonuclease (PARN)

Poly(A)-specific 3' exoribonuclease is a widely expressed protein with Poly(A) deadenylase activity that participates in the regulation of global mRNA levels during development [131]. In addition, PARN also deadenylates small nucleolar RNAs [40]. A recent exome sequencing study linked PARN mutations with pulmonary fibrosis and telomere shortening [128].

A subsequent study, also based on exome sequencing, identified biallelic mutations in the PARN gene in three families with individuals exhibiting severe DC [85]. Two of the families were homozygous for one missense variant and one Splicing-altering variant, respectively. The third affected patient was a compound heterozygous. These patients exhibited reduced TERC, DKC1, RTEL1 and TERF1 mRNA levels. Cells from these patients showed activated DNA-damage response associated to nuclear p53 regulation, cell-cycle arrest and reduced cell viability upon UV treatment [85]. These results supported a potential link between PARN, the p53-dependent pathway and telomere shortening [132]. A subsequent study using cells derived from these patients has shown that PARN is required for the 3'-maturation of the telomerase RNA component [41]. Specifically, PARN is required for removal of the oligo(A) tails post-transcriptionally added to the TR 3' end and that target nuclear RNAs for degradation.

2.3.2. *Hoyeraal-Hreidarsson syndrome*

The Hoyeraal-Hreidarsson syndrome (HH) is frequently considered a severe variant of DC, typically presented in infancy [133]. The first patients with this syndrome were described by Hoyeraal et al [134] and Hreidarsson et al [135]. However, the eponym was first proposed in 1995 in a case report of a child with clinical features very similar to those described by Hoyeraal and Hreidarsson [136]. About 50 cases of HH have been reported since the first description [86]. HH is a multisystem genetic disorder and represents the extreme phenotype of the telomere biology disorders. Peripheral blood cells from these patients present very short telomeres, below the first percentile for their age. Clinical manifestations typically present early in childhood. These patients present developmental problems such as cerebellar hypoplasia, microcephaly, developmental delay and intrauterine growth retardation (IUGR). In addition, typically present immunodeficiency and progressive bone marrow failure. In addition to these specific symptoms, HH patients can also present clinical manifestations found in DC patients. For example, the typical triad of mucocutaneous alterations shown in DC patients can also be present at diagnosis or develop with time in HH patients. Other DC-associated symptoms that are also present in some HH patients include immunodeficiency, prematurity, dysmorphism, gastrointestinal features and neurological symptoms. Among these symptoms, cerebellar hypoplasia is considered a requirement for the diagnosis of HH [75, 137]. Other neurological complications include impaired myelination, seizures, hypoplastic corpus callosum and intracranial calcifications (reviewed in Glousker et al. [86]). Immunodeficiency is observed in a large proportion of HH patients with increased susceptibility to life-threatening infections. Over half of the patients present with lymphopenia [86]. The T cell compartment is less frequently affected although abnormalities of T cell proliferation have been observed [138]. There are also some reports of severe combined immunodeficiency [139]. Therefore, any child presenting with humoral deficiency or combined immunodeficiency and neurological features (microcephaly, cerebellar hypoplasia) should be considered a possible HH patient. Digestive tract anomalies are frequent in HH patients and include oesophageal strictures, severe enteropathy and colitis [140]. Other clinical complications include skeletal malformations [141], urinary tract abnormalities [136, 142], and ophthalmological signs [136, 142].

2.3.2.1.1. *Molecular genetics of Hoyeraal-Hreidarsson syndrome*

As mentioned above, HH can be considered as severe form of DC and, in agreement with this consideration, some of the genes mutated in DC are also found mutated in HH patients [86]. The specific mutations present in HH patients can be different to those found in DC so that mutations that affect more importantly protein function are associated to HH. In other cases the difference is found in allele composition so that some mutations are found in homozygosis or compound heterozygosis in HH and in heterozygosis in DC. The mutations presently associated to HH will be briefly described in the following paragraphs and the genes affected are indicated in Table 1.

2.3.2.1.1.1 Dyskerin (DKC1)

DKC1 mutations cause DC and also HH so that 13 out of the over 50 different mutations presently known cause DC and HH and two of them are only found in HH (T49M and S304N) [68, 143]. No clear correlation has been found between the location of the mutation on dyskerin functional domains and the severity of the disease. Indeed, some mutations are associated with variable severity from mild DC to HH, like the A353V mutation [144]. The two HH-associated mutations are located to the catalytic TruB domain suggesting that pseudouridylation activity is important for telomerase function [143].

2.3.2.1.1.2 Telomerase Reverse Transcriptase (TERT)

Mutations in the TERT gene have been found in HH patients but not as frequently as in DC patients. From the more than 50 TERT mutations related to telomere biology disorders only five are implicated in HH. Four of them cause HH in homozygosis (T567M, R901W) [145, 146] or compound heterozygosis (P530L, A880T) [147]. Carriers of these mutations have short telomeres without reported clinical manifestations. The A880T and R901W mutations fall into the TERT catalytic reverse transcriptase domain and the T567M mutation in the RNA-binding domain. These mutations greatly impair telomerase activity and processivity, respectively [146]. Only one autosomal dominant TERT mutation has been associated with HH (F1127L) but it was also found in the healthy mother with could indicate the presence of a second, paternal, mutation or disease anticipation [148].

2.3.2.1.1.3 TERF1- interacting nuclear factor 2 (TINF2)

The shelterin component TIN2 is encoded by the gene TINF2 and has an important role by interacting with the double-stranded DNA binding proteins TRF1/TRF2 and the single-stranded DNA binding heterodimer TPP1/POT1, as mentioned above. Three of the over 20 DC-associated TINF2 mutations have been found in HH patients. These mutations were de novo or inherited in an autosomal-dominant manner [100, 111].

2.3.2.1.1.4 Regulator of telomere elongation helicase 1 (RTEL1)

The RTEL1 protein is a DNA helicase required for telomere replication, as mentioned above. Presently, 18 RTEL1 mutations have been described in 17 HH patients. Most RTEL1 mutations were biallelic, with either homozygous or compound heterozygous recessive inheritance. The mutations were located in domains involved in protein-protein interaction or ubiquitin transfer [127, 142].

2.3.2.1.5 TPP1 (ACD)

The protein TPP1 (TINT1, PTP, PIP1) is encoded by the Adrenocortical Dysplasia Homolog (ACD) gene and is a component of the shelterin complex, as previously described (Section 2.1). Three functional domains have been identified in this protein. The N-terminal OB domain is involved in the interaction of TPP1 with TERT that participates in the recruitment of the telomerase complex to telomeres through the TEL patch and increases telomerase processivity [45, 46]. The central domain is required for heterodimer formation with POT1 [28, 149]. The C-terminal domain binds TIN2 to form the shelterin complex, as mentioned above [150]. Whole exome sequencing discovered a mutation at the TEL patch of TPP1 together with a missense mutation in this same gene in a compound heterozygous HH patient [151]. The TEL patch mutation was a single amino acid deletion and resulted in a reduction of telomerase processivity and recruitment to telomeres. This same mutation has been identified in a family with aplastic anemia and other DC symptoms and was transmitted in a dominant inheritance manner [152].

2.3.2.1.6 Poly(A)-specific 3' exoribonuclease PARN

The Poly(A)-specific 3' exoribonuclease is involved in processing of the telomerase RNA, TR, as mentioned above. A recent work identified PARN mutations in three families with individuals exhibiting severe DC [85]. Actually, some of these patients had a disease classified as HH syndrome associating PARN mutations to this disease [132]. These patients presented biallelic mutations in the PARN gene indicating a recessive manner of inheritance.

2.3.3. *Revesz syndrome*

The syndrome of Revesz (RS) is a telomere biology disorder that affects young children. This disease was first reported by Revesz et al as a case of a 6-month-old children with bilateral exudative retinopathy that developed a severe bone marrow failure [153]. This and subsequent reports indicated the following symptoms, summarized in Table 1: intrauterine growth retardation, intracranial calcifications, developmental delay, fine sparse hair and nail dystrophy. The clinical presentations have several symptoms in common with DC and the specific diagnosis of RS requires identification of bilateral exudative retinopathy [154]. Besides common manifestations, the relation of RS with DC and other telomere biology disorders was confirmed because RS patients have very short telomeres and present mutations in the TIN2 gene, that encodes the TIN2 shelterin component [111].

2.3.4. *Coats plus syndrome/CRMCC*

The Coats plus syndrome (CPS) is also known as cerebroretinal microangiopathy with calcifications and cysts (CRMCC). Coats plus patients have bilateral exudative retinopathy, retinal telangiectasias, intrauterine growth retardation, intracranial calcifications, bone abnormalities with poor healing, and gastrointestinal vascular ectasias (Table 1). Some patients also present DC-related features such as dystrophic nails, sparse or greying hair and anemia. Intracranial calcifications and bilateral exudative retinopathy are also present in RS patients but Coats plus patients also present cerebellar and hematologic manifestations [12, 56].

Autosomal recessive compound heterozygous mutations in CTC1 have been described in CPS identifying this syndrome as a telomere biology disorder [155-157]. As mentioned above, the protein Conserved telomere maintenance component 1 (CTC1) is required for telomere elongation. Actually, mutations in CTC1 probably account for most of the CTS cases. In addition, telomeres that are below the first percentile for age have been found in CTS patients and telomeres from heterozygous carriers have a length below average [155].

2.3.5. *Aplastic anemia*

Aplastic anemia is one of the clinical manifestations of telomere biology disorders in adults usually associated to mutations in TERT and TERC. Symptoms in these patients are milder than in children and mucocutaneous features are infrequent [12, 56]. Aplastic anemia can have very different causes and there are inherited and acquired forms of the disease. Acquired forms can be related to environmental exposures and infectious, among other factors, and is immune-mediated. Inherited aplastic anemia has been reported to occur in patients with Fanconi anemia, Shwachman-Diamond syndrome and other inherited bone marrow failures, including DC. It has been described that approximately 10% of patients with isolated aplastic anemia have mutations in TERC and TERT genes [158]. These mutations usually present an autosomal dominant manner of inheritance. Telomere length in these patients is usually below the 10% percentile for age [159]. The existence of symptoms related to telomere biology disorders in relatives of these patients, such as pulmonary fibrosis, mild cytopenias, leukemia and squamous cell cancer, can be of great help for their diagnosis [12].

2.3.6. *Pulmonary fibrosis*

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a lung disease characterized by progressive interstitial fibrosis that has a poor prognosis (median survival time of 2-3 years) [160]. Diagnosis of pulmonary fibrosis, also known as interstitial pneumonia, is made by the presence of honeycombing on high-resolution computerized tomography (HRCT). In addition to pulmonary fibrosis, these patients can present a range of pulmonary pathologies, including bronchiolitis, obliterans organizing pneumonia, chronic hypersensitive pneumonia and emphysema alone or combined with pulmonary fibrosis (Table 1) [56]. Familial forms of pulmonary fibrosis have been also described and might represent up to 20% of the cases [161]. The study of these familial forms identified mutations in TERT and TERC in 8-15 % of the cases [162, 163], establishing IPF as a telomere biology disorder. IPF is inherited in these families as an autosomal dominant trait. This observation is supported by animal models since TERT null mice have decreased number of alveolar epithelial cells [164]. TRF1 deletion in type II alveolar cells also causes pulmonary fibrosis in mice [165].

Heterozygous mutations in genes coding for telomere-related proteins have been found in 15-20% of IPF families without a history of DC [162, 163, 166] and 1-3% of sporadic cases of IPF [167]. In addition, 20% of patients with DC develop pulmonary fibrosis [57, 58]. In agreement with these observations, IPF patients have significantly shorter telomeres than age-matched controls. Actually, IPF is the most common manifestation of telomere biology disorders since DC and AA have much lower prevalence [168]. IPF due to telomere dysfunction

presents in adulthood, into middle age [164]. The gene most frequently mutated in IPF patients is TERT [8-15% of familial cases) but mutations have been also found in TERC (<1%), DKC1 (<1%)[169], TINF2 (<1%)[170], RTEL1 [5%][128, 166] and PARN [4%] [128]. TERT mutations have been also found in smokers with severe emphysema at a frequency of 1% [171]. Telomere dysfunction due to these genetic mutations can originate irreversible alveolar stem cell failure that would be at the origin of pulmonary fibrosis and emphysema [72, 162]. IPF patients that carry mutations in telomere-related genes can also present extra-pulmonary manifestations related to telomere biology disorders such as bone marrow failure including red blood cells, single lineage cytopenias or aplastic anemia [164]. Actually, the complex syndrome of IPF and bone marrow failure predicted the presence of TERT or TERC mutations in 10 families that presented these diseases in consecutive generations [172].

Short telomere length is a common finding in IPF patients, even in those without mutations in telomere-related genes [167]. These results could indicate that IPF may be more likely to develop in those individuals that naturally present shorter telomeres in the general population. These individuals might also have increased incidence of other telomere-related disorders such as cryptogenic liver cirrhosis and diabetes [58].

2.3.7. Liver disease

The study of five families with liver disease in combination with hematologic and autoimmune disorders identified mutations in TERT and TERC [65]. A subsequent study of patients with idiopathic liver cirrhosis also found an increased frequency of TERT and TERC mutations [3.7% vs 0.85% in the control population) [173]. Affected patients presented reduced telomerase activity and short telomere length in peripheral blood cells. They also have increased probability to progress to end-stage liver disease. In addition, liver disease, including hepatic fibrosis, noncirrhotic portal hypertension, and hepatopulmonary syndrome has been reported in DC patients (Table 1) [62, 64].

2.4. Treatment of telomere biology disorders

Treatment of diseases with several organs potentially compromised has many practical complications. Presently, there are no curative therapies for many of the clinical manifestations of telomere biology disorders. The major causes of decease in these patients are bone marrow failure and pulmonary fibrosis and in this section we will summarize the present treatment of these pathologies. In the second part we will describe some of the experimental strategies that are being used to generate new therapies for telomere biology disorders.

2.4.1. Present treatment of telomere biology diseases

Hematopoietic stem cells transplantation (HSCT) is the only treatment than can cure bone marrow failure in these patients. Donor's selection requires special attention in telomere biology disorders since relatives might be silent carriers of the mutations, given the clinical heterogeneity of these diseases. This circumstance has been reported in two cases and there was a failure either to engraft or to mobilize stem cells from the graft [174]. Analysis of the

outcome of 34 DC patients transplanted with bone marrow indicated higher rates of mortality and morbidity due to respiratory complications and graft failure [175]. Best results were obtained transplanting grafts from HLA-matched siblings but the 10-year probability of survival was 30% in this study. Conditioning of transplanted DC patients may also contribute to long-term development of pulmonary fibrosis and liver disease. Therefore, the use of reduced intensity conditioning, avoiding radiotherapy, busulfan and high dose of cyclophosphamide might benefit to these patients [176].

Androgen therapy has been also used for telomere biology disorder patients with bone marrow failure. These patients seem to be responsive to male hormones [177]. The mechanism involved seems to be that male hormones modulate TERT gene expression and increase telomerase activity [178]. In a retrospective analysis of 16 DC patients treated with androgens, 11 achieved clinically significant hematologic response [179]. Telomere elongation after androgen treatment has been reported in one case [180]. However, androgens can have side effects such as masculinisation, liver function abnormalities, hyperlipidemia and splenic peliosis (when androgens are used in conjunction with GCSF) and telomere biology disorders patients can be specially sensitive to these effects [181]. The androgen-stimulating hormone Danazol has less masculinising side effects and has been also used for treatment of DC patients [182].

Treatment of idiopathic pulmonary fibrosis is presently mainly supportive with pulmonary rehabilitation therapy and the administration of supplemental oxygen. Recently, two pharmacological agents, pirfenidone [183] and nintedanib [184] were shown to reduce lung function decline in IPF patients. Danazol administration has also been described to slow down the progression of pulmonary fibrosis in DC patients [182]. However, lung transplantation is the only curative strategy available. Lung transplantation was successfully used in a patient after HSCT [185]. The study of a small series of IPF patients with TERC or TERT mutations showed a favourable short term output with 7 of 8 patients alive after a median follow-up of 1,9 years. However, frequent haematological, renal and infectious complications were observed [186].

Because of the lack of curative therapies, telomere biology disorder's management are presently based on supportive measures and close follow-up for medium and long term complications [55]. Regular clinical review to monitor organ-specific disease progression, such as haematological analysis and pulmonary function testing must be performed. Surveillance for the appearance of dermatological and digestive tumours is important for early detection and complete surgical resection. Preventive measures such as avoidance of potential carcinogens (tobacco smoke, sun exposure) and adequate dental hygiene are also very important.

2.4.2. Experimental strategies for treatment of telomere biology disorders

Important efforts for the development of mice models of telomere biology disorders aimed to the development of novel therapies have been made in the last years [187]. However, the existence of very long telomeres in the mice strains used for experimentation (50-100 kb) has made of this a difficult task. Mice strains with defective telomerase activity have been generated [187, 188] but they have to be crossed for 4-5 generations before their telomeres are sufficiently short to manifest telomere-associated defects [189]. The use of mice with short

telomeres to generate telomerase-deficient strains provided a better experimental model [190]. Mouse models carrying mutations in *DKC1* have been also generated [191]. More recently, tissue-specific inactivation of genes related to telomere biology has been used to generate mice models of these diseases. For example, mice models of bone marrow failure and pulmonary fibrosis were generated by deleting the *TRF1* gene in the hematopoietic compartment and type II alveolar cells, respectively [165, 192]. However, these mouse models did not completely reproduce the human disease and telomere size was not reduced [190, 191]. Mice lacking the p53 C-terminal domain had short telomeres and suffer from aplastic anemia and pulmonary fibrosis and could be a useful model for the study of telomere biology disorders [193].

Telomere biology disorders are caused by mutations in a single gene in most patients and could be, therefore, amenable for gene therapy strategies. An important caveat is that telomere length is narrowly controlled and excessively long telomeres increase the probability of developing some cancers such as melanoma [13]. Mice over-expressing *TERT* also develop a large number of tumors unless the tumor-suppressor protein p53 is also overexpressed [194]. Raval et al recently showed that inducible reactivation of telomerase activity could reverse defective hematopoiesis caused by telomere shortening in *TERT*-deleted mice [189] opening new perspectives to gene therapy approaches. Transient expression of *TERT* also extends telomeres in human cells [195]. Recent reports indicate that *TERT* plays roles beyond telomeres and contributes to stem cells maintenance and cell reprogramming which might offer new therapeutics targets for telomere biology disorders [196].

Telomere shortening results in the accumulation of DNA damage at telomeres and the activation of the p53 pathway, as mention above. A DC mouse model in which mice carries a *DKC1* exon 15 deletion demonstrated that mutant cells had a growth retardation compared to wild-type cells [191]. Mutant cells accumulated increased levels of DNA damage. In addition, these cells are hypersensitive to oxygen and accumulate reactive oxygen species. Treatment of these cells with the antioxidant N-acetyl cysteine increased cell growth, both in vitro and in vivo. Competitive bone marrow repopulation studies showed that the *DKC1* mutation is associated with a functional stem cell defect consistent with accelerated senescence. This stem cell defect was partially reverted by N-acetyl cystein treatment of the animals [197]. These results suggest that antioxidant treatment may prevent or delay some DC manifestations.

A new therapeutic opportunity came from the observation that a dyskerin motif, corresponding to the TruB domain of the protein (GSE24.2), reactivated telomerase activity in DC-patients and human telomerase-deficient cells [198]. This peptide activated human *TERT* promoter in a c-myc expression-dependent manner. GSE24.2 rescued DC-fibroblasts from premature senescence. The peptide also increased the telomerase RNA, TR, expression trough stabilization of the molecule [199]. DC-cells presented increased DNA damage at the telomeres and increased levels of oxidative stress. Expression of GSE24.2 decreased both DNA damage and oxidative stress of the cells that expressed a *DKC1* mutant protein [200]. Subsequent studies demonstrated that a shorter fragment of GSE24.2, named GSE4, maintained the same biological activity and induced telomerase activity and cell proliferation of *DKC*-mutant cells. In addition, DNA damage, oxidative stress and cell senescence were reduced upon expression of GSE4 [201]. GSE24.2 could be delivered to cells using surface modified biodegradable

polymeric nanoparticles, which might facilitate their administration to patients [202]. These results open a new therapeutic opportunity for the treatment of telomere biology disorders and GSE24.2 was recently approved by the EMA as an orphan drug for DC treatment (EU/3/12/1070-EMA/OD/136/11].

2.5. Conclusion

Telomere biology disorders, also named telomeropathies, compose a group of diseases with diverse clinical presentations, affecting several systems, but a common genetic etiology. Telomere maintenance or protection is defective in the patients affected by these diseases and, as a consequence, they present short telomeres. Critically short telomeres induce cell death or senescence impairing cell proliferation. Cell renewal in adult tissues depends on the proliferation of stem cells. In patients with defects in telomere biology, telomeres of stem cells are shortened after each cell cycle and get exhausted much earlier than in healthy individuals which impairs tissue renewal. This effect is specially important in highly proliferative tissues such as bone marrow, lymphocytes and epithelial tissues, including lung alveolar epithelia, that are the tissues mainly affected in patients with telomere biology disorders.

The severity of the disease seems to be dependent on the functional alterations that each mutation causes in the biological activity of the corresponding protein. The genetic doses is also very important since patients that are homozygous for the mutation or compound heterozygous for more than one mutation usually present more severe symptoms of the disease that manifest at an early age. These forms of the disease are inherited in a recessive or X-linked manner. Heterozygous patients might be healthy carriers but they can also present milder forms of the disease that present at an older age, generally in adults. These disease manifestations are inherited in an autosomal dominant manner. There is also an association between the severity of the disease and the tissues affected. High-turnover tissues are affected in younger patients and as a more severe disease. For example, the main manifestation in infancy is severe immunodeficiency affecting B cells, T cells and NK cells that have high replication rates. Bone marrow defects manifests later in children and young adults as isolated cytopenias and aplastic anemia. The gastrointestinal epithelium is also affected in children and young adults. In contrast, telomere phenotypes predominantly manifest in slow-turnover tissues such as lung and liver in adults [9]. There is also a strong correlation between the size of the telomeres, as determined in peripheral blood cells, the severity of the disease and the time of presentation so that patients younger and with more severe presentation have shorter telomeres [12].

Genetic anticipation can also have a relevant influence in the presentation and evolution of these diseases. As previously described, patients and healthy carriers of telomere biology disease can transmit shortened telomeres to their descendants. If descendants are affected by the disease, their stem cells will present critically short telomeres at an early age that the previous generation, anticipating the time of onset and increasing the severity of the disease [74]. For example, a large family has been described with several patients manifesting IPF, bone marrow failure or a combined phenotype. There seemed to be a difference of several

decades in the onset of the disease between generations with IPF manifesting in older individuals (mean 51 years) and bone marrow failure in younger ones [14 years] [172].

The heterogeneous presentation of telomere biology diseases make difficult their diagnosis as already mentioned in the description of DC (section 2.3.1). In addition, some of the symptoms also occur in patients with other diseases. For example, inherited bone marrow failure is also observed in patients with Fanconi anemia, Shwachmann-Diamond syndrome and other inherited BMFs. However, differentiating DC-associated BMF is important for patient management since, for example, these patients often do not respond to immunosuppressive therapy. One important criterion for diagnosis of telomere biology disorders is the presence of short telomeres in comparison to the aged healthy population, usually lower than the 1% percentile. However, some IPF patients present short telomeres even in the absence of mutations in telomere biology related genes [167]. Therefore, an accurate diagnosis requires establishing the molecular basis of the disease, identifying the causative mutation. Molecular diagnosis can be done sequencing the exons contained in the genes presently known to be mutated in telomere biology disorders. However, the high number of candidate genes and the large number of exons present in some of them makes this approach time-consuming and expensive. Alternatively, sequencing by exome sequencing techniques all exons of patients and close relatives is becoming a more attractive, faster and cheaper method [84]. In addition, exome sequencing allows the identification of mutations in genes that have not been previously related to telomere biology (see [128] for a recent example).

These diseases can be considered an example of the importance of precision medicine for diagnosis but also for patient managing and genetic counselling. The importance in diagnosis is enforced by the elevated heterogeneity of the clinical presentations in several systems that can create some uncertainty until a genetic analysis is performed. The importance for patient management derives from the possible progressive alteration of different organs, as mentioned above. This progression with time is very characteristic of telomerase biology disorders and can only be predicted by a precise molecular diagnosis. Disease progression also determines the therapeutic treatment. As mentioned above, the only curative alternatives are organ transplantation, either hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) or lung transplantation. However, in telomere biology disorders both transplants have specific complications. Reduced intensity conditioning is advised and patients frequently present graft failure. In the case of HSCT respiratory complications have been described. In contrast, haematological, renal and infectious complications were observed after lung transplantation. Both complications could be expected for the multi-systemic nature of these diseases.

Precision medicine is also important for genetic counselling in telomere biology disorders [12]. Depending on the mutation, these diseases can have different manners of inheritance. The phenotypic penetrance of each mutation can be different. Heterozygous clinically silent carriers can be found whose long-term evolution is not yet understood. Patients treated for a symptom can develop a different one later on. As mentioned above, supportive measures and close follow-up of patients and carrier relatives is also very important. All these characteristics, specific to these diseases, might be difficult to transmit to the patients and their relatives what

makes even more important to provide appropriate genetic education and counselling to the families.

As mentioned above, presently there are no really curative alternatives for these diseases. Lung transplantation and HSCT are important therapeutic interventions but, unfortunately, with a short time of survival. Some experimental therapies are promising but new curative therapies are urgently needed and should be the focus of intensive research in the near future.

Acknowledgements

This work was supported by grant PI1401495 from Fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III, Spain, supported by FEDER funds. CM-G is supported by the CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER).

Author details

Rosario Perona^{1,2,3*}, Laura Iarriccio^{1,4}, Laura Pintado-Berninches^{1,4},
Javier Rodriguez-Centeno^{1,4}, Cristina Manguan-Garcia^{1,2}, Elena Garcia⁴,
Blanca Lopez-Ayllón^{1,3} and Leandro Sastre^{1,2,3}

*Address all correspondence to: lsastre@iib.uam.es

1 Instituto de Investigaciones Biomedicas, CSIC/UAM, Madrid, Spain

2 CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), Valencia, Spain

3 Biomarkers and Experimental Therapeutics in Cancer, IdiPaz, Madrid, Spain

4 Advanced Medical Projects, Madrid, Spain

References

- [1] McElligott R, Wellinger RJ. The terminal DNA structure of mammalian chromosomes. *EMBO J.* 1997 Jun 16;16(12):3705-14.
- [2] de Lange T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev.* 2005 Sep 15;19(18):2100-10.
- [3] Karlseder J, Broccoli D, Dai Y, Hardy S, de Lange T. p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science.* 1999 Feb 26;283(5406):1321-5.

- [4] Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*. 1990 May 31;345(6274):458-60.
- [5] Blackburn EH, Greider CW, Szostak JW. Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging. *Nat Med*. 2006 Oct;12(10):1133-8.
- [6] Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell*. 1985 Dec;43(2 Pt 1):405-13.
- [7] Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*. 1994 Dec 23;266(5193):2011-5.
- [8] Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W, Shay JW. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet*. 1996;18(2):173-9.
- [9] Armanios M. Telomeres and age-related disease: how telomere biology informs clinical paradigms. *J Clin Invest*. 2013 Mar;123(3):996-1002.
- [10] Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell*. 2013 Jun 6;153(6):1194-217.
- [11] Nabetani A, Ishikawa F. Alternative lengthening of telomeres pathway: recombination-mediated telomere maintenance mechanism in human cells. *J Biochem*. 2010 Jan;149(1):5-14.
- [12] Savage SA. Human telomeres and telomere biology disorders. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2014;125:41-66.
- [13] Stanley SE, Armanios M. The short and long telomere syndromes: paired paradigms for molecular medicine. *Curr Opin Genet Dev*. 2015 Aug;33:1-9.
- [14] Horn S, Figl A, Rachakonda PS, Fischer C, Sucker A, Gast A, et al. TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. *Science*. 2013 Feb 22;339(6122):959-61.
- [15] Huang FW, Hodis E, Xu MJ, Kryukov GV, Chin L, Garraway LA. Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma. *Science*. 2013 Feb 22;339(6122):957-9.
- [16] Aoude LG, Pritchard AL, Robles-Espinoza CD, Wadt K, Harland M, Choi J, et al. Nonsense mutations in the shelterin complex genes ACD and TERF2IP in familial melanoma. *J Natl Cancer Inst*. 2015 Feb;107(2):pii:dju408.
- [17] Bainbridge MN, Armstrong GN, Gramatges MM, Bertuch AA, Jhangiani SN, Daddapaneni H, et al. Germline mutations in shelterin complex genes are associated with familial glioma. *J Natl Cancer Inst*. 2015 Jan;107(1):384.
- [18] Bertuch AA. The Molecular Genetics of the Telomere Biology Disorders. *RNA Biol*. 2016; 13(8):696-706.

- [19] Giardini MA, Segatto M, da Silva MS, Nunes VS, Cano MI. Telomere and telomerase biology. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2014;125:1-40.
- [20] Aubert G, Baerlocher GM, Vulto I, Poon SS, Lansdorp PM. Collapse of telomere homeostasis in hematopoietic cells caused by heterozygous mutations in telomerase genes. *PLoS Genet.* 2012;8(5):e1002696.
- [21] Kipling D, Cooke HJ. Hypervariable ultra-long telomeres in mice. *Nature.* 1990 Sep 27;347(6291):400-2.
- [22] Blasco MA. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet.* 2005 Aug;6(8):611-22.
- [23] de Lange T, Shiue L, Myers RM, Cox DR, Naylor SL, Killery AM, et al. Structure and variability of human chromosome ends. *Mol Cell Biol.* 1990 Feb;10(2):518-27.
- [24] de Lange T. T-loops and the origin of telomeres. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004 Apr; 5(4):323-9.
- [25] Cooper JP, Nimmo ER, Allshire RC, Cech TR. Regulation of telomere length and function by a Myb-domain protein in fission yeast. *Nature.* 1997 Feb 20;385(6618): 744-7.
- [26] Broccoli D, Smogorzewska A, Chong L, de Lange T. Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. *Nat Genet.* 1997 Oct;17(2):231-5.
- [27] Ye JZ, Donigian JR, van Overbeek M, Loayza D, Luo Y, Krutchinsky AN, et al. TIN2 binds TRF1 and TRF2 simultaneously and stabilizes the TRF2 complex on telomeres. *J Biol Chem.* 2004 Nov 5;279(45):47264-71.
- [28] Liu D, O'Connor MS, Qin J, Songyang Z. Telosome, a mammalian telomere-associated complex formed by multiple telomeric proteins. *J Biol Chem.* 2004 Dec 3;279(49): 51338-42.
- [29] Chen LY, Redon S, Lingner J. The human CST complex is a terminator of telomerase activity. *Nature.* 2012 Aug 23;488(7412):540-4.
- [30] Garcia-Cao M, O'Sullivan R, Peters AH, Jenuwein T, Blasco MA. Epigenetic regulation of telomere length in mammalian cells by the Suv39h1 and Suv39h2 histone methyltransferases. *Nat Genet.* 2004 Jan;36(1):94-9.
- [31] Karlseder J, Hoke K, Mirzoeva OK, Bakkenist C, Kastan MB, Petrini JH, et al. The telomeric protein TRF2 binds the ATM kinase and can inhibit the ATM-dependent DNA damage response. *PLoS Biol.* 2004 Aug;2(8):E240.
- [32] Wu L, Multani AS, He H, Cosme-Blanco W, Deng Y, Deng JM, et al. Pot1 deficiency initiates DNA damage checkpoint activation and aberrant homologous recombination at telomeres. *Cell.* 2006 Jul 14;126(1):49-62.

- [33] Diotti R, Loayza D. Shelterin complex and associated factors at human telomeres. *Nucleus*. 2011 Mar-Apr;2(2):119-35.
- [34] Nandakumar J, Cech TR. Finding the end: recruitment of telomerase to telomeres. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013 Feb;14(2):69-82.
- [35] Martinez P, Blasco MA. Replicating through telomeres: a means to an end. *Trends Biochem Sci*. 2015 Sep;40(9):504-15.
- [36] Schmidt JC, Cech TR. Human telomerase: biogenesis, trafficking, recruitment, and activation. *Genes Dev*. 2015 Jun 1;29(11):1095-105.
- [37] Watson JD. Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat New Biol*. 1972 Oct 18;239(94):197-201.
- [38] Greider CW, Blackburn EH. A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature*. 1989 Jan 26;337(6205):331-7.
- [39] Mitchell JR, Cheng J, Collins K. A box H/ACA small nucleolar RNA-like domain at the human telomerase RNA 3' end. *Mol Cell Biol*. 1999 Jan;19(1):567-76.
- [40] Berndt H, Harnisch C, Rammelt C, Stohr N, Zirkel A, Dohm JC, et al. Maturation of mammalian H/ACA box snoRNAs: PAPD5-dependent adenylation and PARN-dependent trimming. *RNA*. 2012 May;18(5):958-72.
- [41] Moon DH, Segal M, Boyraz B, Guinan E, Hofmann I, Cahan P, et al. Poly(A)-specific ribonuclease (PARN) mediates 3'-end maturation of the telomerase RNA component. *Nat Genet*. 2015 Dec;47(12):1482-8.
- [42] Angrisani A, Vicidomini R, Turano M, Furia M. Human dyskerin: beyond telomeres. *Biol Chem*. 2014 Jun;395(6):593-610.
- [43] Egan ED, Collins K. Specificity and stoichiometry of subunit interactions in the human telomerase holoenzyme assembled in vivo. *Mol Cell Biol*. 2010 Jun;30(11):2775-86.
- [44] Venteicher AS, Abreu EB, Meng Z, McCann KE, Terns RM, Veenstra TD, et al. A human telomerase holoenzyme protein required for Cajal body localization and telomere synthesis. *Science*. 2009 Jan 30;323(5914):644-8.
- [45] Zhong FL, Batista LF, Freund A, Pech MF, Venteicher AS, Artandi SE. TPP1 OB-fold domain controls telomere maintenance by recruiting telomerase to chromosome ends. *Cell*. 2012 Aug 3;150(3):481-94.
- [46] Nandakumar J, Bell CF, Weidenfeld I, Zaug AJ, Leinwand LA, Cech TR. The TEL patch of telomere protein TPP1 mediates telomerase recruitment and processivity. *Nature*. 2012 Dec 13;492(7428):285-9.
- [47] Williamson JR, Raghuraman MK, Cech TR. Monovalent cation-induced structure of telomeric DNA: the G-quartet model. *Cell*. 1989 Dec 1;59(5):871-80.

- [48] Vannier JB, Pavicic-Kaltenbrunner V, Petalcorin MI, Ding H, Boulton SJ. RTEL1 dismantles T loops and counteracts telomeric G4-DNA to maintain telomere integrity. *Cell*. 2012 May 11;149(4):795-806.
- [49] Sarek G, Vannier JB, Panier S, Petrini JH, Boulton SJ. TRF2 recruits RTEL1 to telomeres in S phase to promote t-loop unwinding. *Mol Cell*. 2015 Feb 19;57(4):622-35.
- [50] Vannier JB, Sandhu S, Petalcorin MI, Wu X, Nabi Z, Ding H, et al. RTEL1 is a replisome-associated helicase that promotes telomere and genome-wide replication. *Science*. 2013 Oct 11;342(6155):239-42.
- [51] Stewart JA, Wang F, Chaiken MF, Kasbek C, Chastain PD, 2nd, Wright WE, et al. Human CST promotes telomere duplex replication and general replication restart after fork stalling. *EMBO J*. 2012 Aug 29;31(17):3537-49.
- [52] Wang F, Stewart JA, Kasbek C, Zhao Y, Wright WE, Price CM. Human CST has independent functions during telomere duplex replication and C-strand fill-in. *Cell Rep*. 2012 Nov 29;2(5):1096-103.
- [53] Sfeir AJ, Chai W, Shay JW, Wright WE. Telomere-end processing the terminal nucleotides of human chromosomes. *Mol Cell*. 2005 Apr 1;18(1):131-8.
- [54] Wu P, Takai H, de Lange T. Telomeric 3' overhangs derive from resection by Exo1 and Apollo and fill-in by POT1b-associated CST. *Cell*. 2012 Jul 6;150(1):39-52.
- [55] Barbaro P, Ziegler DS, Reddel RR. The wide-ranging clinical implications of the Short Telomere Syndromes. *Intern Med J*. 2016; 46(4):393-403.
- [56] Townsley DM, Dumitriu B, Young NS. Bone marrow failure and the telomeropathies. *Blood*. 2014 Oct 30;124(18):2775-83.
- [57] Kropski JA, Blackwell TS, Loyd JE. The genetic basis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*. 2015 Jun;45(6):1717-27.
- [58] Armanios M. Telomerase and idiopathic pulmonary fibrosis. *Mutat Res*. 2012 Feb 1;730(1-2):52-8.
- [59] Dokal I. Dyskeratosis congenita in all its forms. *Br J Haematol*. 2000 Sep;110(4):768-79.
- [60] Heiss NS, Knight SW, Vulliamy TJ, Klauck SM, Wiemann S, Mason PJ, et al. X-linked dyskeratosis congenita is caused by mutations in a highly conserved gene with putative nucleolar functions. *Nat Genet*. 1998 May;19(1):32-8.
- [61] Atkinson JC, Harvey KE, Domingo DL, Trujillo MI, Guadagnini JP, Gollins S, et al. Oral and dental phenotype of dyskeratosis congenita. *Oral Dis*. 2008 Jul;14(5):419-27.
- [62] Ballev BJ, Savage SA. Updates on the biology and management of dyskeratosis congenita and related telomere biology disorders. *Expert Rev Hematol*. 2013 Jun;6(3):327-37.

- [63] Pignolo RJ, Suda RK, McMillan EA, Shen J, Lee SH, Choi Y, et al. Defects in telomere maintenance molecules impair osteoblast differentiation and promote osteoporosis. *Aging Cell*. 2008 Jan;7(1):23-31.
- [64] Dokal I. Dyskeratosis congenita. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2011;2011:480-6.
- [65] Calado RT, Regal JA, Kleiner DE, Schrump DS, Peterson NR, Pons V, et al. A spectrum of severe familial liver disorders associate with telomerase mutations. *PLoS One*. 2009;4(11):e7926.
- [66] Rackley S, Pao M, Seratti GF, Giri N, Rasimas JJ, Alter BP, et al. Neuropsychiatric conditions among patients with dyskeratosis congenita: a link with telomere biology? *Psychosomatics*. 2012 May-Jun;53(3):230-5.
- [67] Alter BP, Giri N, Savage SA, Rosenberg PS. Cancer in dyskeratosis congenita. *Blood*. 2009 Jun 25;113(26):6549-57.
- [68] Vulliamy TJ, Marrone A, Knight SW, Walne A, Mason PJ, Dokal I. Mutations in dyskeratosis congenita: their impact on telomere length and the diversity of clinical presentation. *Blood*. 2006 Apr 1;107(7):2680-5.
- [69] Knight SW, Heiss NS, Vulliamy TJ, Greschner S, Stavrides G, Pai GS, et al. X-linked dyskeratosis congenita is predominantly caused by missense mutations in the DKC1 gene. *Am J Hum Genet*. 1999 Jul;65(1):50-8.
- [70] Mitchell JR, Wood E, Collins K. A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature*. 1999 Dec 2;402(6761):551-5.
- [71] Vulliamy T, Marrone A, Goldman F, Dearlove A, Bessler M, Mason PJ, et al. The RNA component of telomerase is mutated in autosomal dominant dyskeratosis congenita. *Nature*. 2001 Sep 27;413(6854):432-5.
- [72] Alder JK, Barkauskas CE, Limjunyawong N, Stanley SE, Kembou F, Tudor RM, et al. Telomere dysfunction causes alveolar stem cell failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Apr 21;112(16):5099-104.
- [73] Vulliamy T, Marrone A, Szydlo R, Walne A, Mason PJ, Dokal I. Disease anticipation is associated with progressive telomere shortening in families with dyskeratosis congenita due to mutations in TERC. *Nat Genet*. 2004 May;36(5):447-9.
- [74] Armanios M, Chen JL, Chang YP, Brodsky RA, Hawkins A, Griffin CA, et al. Haploinsufficiency of telomerase reverse transcriptase leads to anticipation in autosomal dominant dyskeratosis congenita. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Nov 1;102(44):15960-4.
- [75] Savage SA, Bertuch AA. The genetics and clinical manifestations of telomere biology disorders. *Genet Med*. 2010 Dec;12(12):753-64.

- [76] Aubert G, Hills M, Lansdorp PM. Telomere length measurement-caveats and a critical assessment of the available technologies and tools. *Mutat Res*. 2012 Feb 1;730(1-2): 59-67.
- [77] Diez Roux AV, Ranjit N, Jenny NS, Shea S, Cushman M, Fitzpatrick A, et al. Race/ethnicity and telomere length in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Aging Cell*. 2009 Jun;8(3):251-7.
- [78] Hemann MT, Strong MA, Hao LY, Greider CW. The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability. *Cell*. 2001 Oct 5;107(1):67-77.
- [79] Letsolo BT, Rowson J, Baird DM. Fusion of short telomeres in human cells is characterized by extensive deletion and microhomology, and can result in complex rearrangements. *Nucleic Acids Res*. 2010 Apr;38(6):1841-52.
- [80] Baird DM, Rowson J, Wynford-Thomas D, Kipling D. Extensive allelic variation and ultrashort telomeres in senescent human cells. *Nat Genet*. 2003 Feb;33(2):203-7.
- [81] Alter BP, Baerlocher GM, Savage SA, Chanock SJ, Weksler BB, Willner JP, et al. Very short telomere length by flow fluorescence in situ hybridization identifies patients with dyskeratosis congenita. *Blood*. 2007 Sep 1;110(5):1439-47.
- [82] Alter BP, Rosenberg PS, Giri N, Baerlocher GM, Lansdorp PM, Savage SA. Telomere length is associated with disease severity and declines with age in dyskeratosis congenita. *Haematologica*. 2012 Mar;97(3):353-9.
- [83] Carrillo J, Martinez P, Solera J, Moratilla C, Gonzalez A, Manguan-Garcia C, et al. High resolution melting analysis for the identification of novel mutations in DKC1 and TERT genes in patients with dyskeratosis congenita. *Blood Cells Mol Dis*. 2012 Oct 15-Dec 15;49(3-4):140-6.
- [84] Sastre L. Exome sequencing: what clinicians need to know. *Advances in Genomics and Genetics*. 2014;4:15-27.
- [85] Tummala H, Walne A, Collopy L, Cardoso S, de la Fuente J, Lawson S, et al. Poly(A)-specific ribonuclease deficiency impacts telomere biology and causes dyskeratosis congenita. *J Clin Invest*. 2015 May;125(5):2151-60.
- [86] Glousker G, Touzot F, Revy P, Tzfati Y, Savage SA. Unraveling the pathogenesis of Hoyeraal-Hreidarsson syndrome, a complex telomere biology disorder. *Br J Haematol*. 2015 Aug;170(4):457-71.
- [87] Schwartz S, Bernstein DA, Mumbach MR, Jovanovic M, Herbst RH, Leon-Ricardo BX, et al. Transcriptome-wide mapping reveals widespread dynamic-regulated pseudouridylation of ncRNA and mRNA. *Cell*. 2014 Sep 25;159(1):148-62.
- [88] Kiss T, Fayet-Lebaron E, Jady BE, Box H/ACA small ribonucleoproteins. *Mol Cell*. 2010 Mar 12;37(5):597-606.

- [89] Tycowski KT, Shu MD, Kukoyi A, Steitz JA. A conserved WD40 protein binds the Cajal body localization signal of scaRNP particles. *Mol Cell*. 2009 Apr 10;34(1):47-57.
- [90] Wong JM, Collins K. Telomerase RNA level limits telomere maintenance in X-linked dyskeratosis congenita. *Genes Dev*. 2006 Oct 15;20(20):2848-58.
- [91] Carrillo J, Gonzalez A, Manguan-Garcia C, Pintado-Berninches L, Perona R. p53 pathway activation by telomere attrition in X-DC primary fibroblasts occurs in the absence of ribosome biogenesis failure and as a consequence of DNA damage. *Clin Transl Oncol*. 2013 Jun;16(6):529-38.
- [92] Bellodi C, Kopmar N, Ruggero D. Deregulation of oncogene-induced senescence and p53 translational control in X-linked dyskeratosis congenita. *EMBO J*. 2010 Jun 2;29(11):1865-76.
- [93] Walbott H, Machado-Pinilla R, Liger D, Blaud M, Rety S, Grozdanov PN, et al. The H/ACA RNP assembly factor SHQ1 functions as an RNA mimic. *Genes Dev*. 2011 Nov 15;25(22):2398-408.
- [94] Grozdanov PN, Fernandez-Fuentes N, Fiser A, Meier UT. Pathogenic NAP57 mutations decrease ribonucleoprotein assembly in dyskeratosis congenita. *Hum Mol Genet*. 2009 Dec 1;18(23):4546-51.
- [95] Brault ME, Lauzon C, Autexier C. Dyskeratosis congenita mutations in dyskerin SUMOylation consensus sites lead to impaired telomerase RNA accumulation and telomere defects. *Hum Mol Genet*. 2013 Sep 1;22(17):3498-507.
- [96] Salowsky R, Heiss NS, Benner A, Wittig R, Poustka A. Basal transcription activity of the dyskeratosis congenita gene is mediated by Sp1 and Sp3 and a patient mutation in a Sp1 binding site is associated with decreased promoter activity. *Gene*. 2002 Jun 26;293(1-2):9-19.
- [97] Lingner J, Hughes TR, Shevchenko A, Mann M, Lundblad V, Cech TR. Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science*. 1997 Apr 25;276(5312):561-7.
- [98] Moriarty TJ, Ward RJ, Taboski MA, Autexier C. An anchor site-type defect in human telomerase that disrupts telomere length maintenance and cellular immortalization. *Mol Biol Cell*. 2005 Jul;16(7):3152-61.
- [99] Bryan TM, Goodrich KJ, Cech TR. Telomerase RNA bound by protein motifs specific to telomerase reverse transcriptase. *Mol Cell*. 2000 Aug;6(2):493-9.
- [100] Podlevsky JD, Bley CJ, Omana RV, Qi X, Chen JJ. The telomerase database. *Nucleic Acids Res*. 2008 Jan;36(Database issue):D339-43.
- [101] Collopy LC, Walne AJ, Cardoso S, de la Fuente J, Mohamed M, Toriello H, et al. Triallelic and epigenetic-like inheritance in human disorders of telomerase. *Blood*. 2015 Jul 9;126(2):176-84.

- [102] Xin ZT, Beauchamp AD, Calado RT, Bradford JW, Regal JA, Shenoy A, et al. Functional characterization of natural telomerase mutations found in patients with hematologic disorders. *Blood*. 2007 Jan 15;109(2):524-32.
- [103] Zaug AJ, Crary SM, Jesse Fioravanti M, Campbell K, Cech TR. Many disease-associated variants of hTERT retain high telomerase enzymatic activity. *Nucleic Acids Res*. 2013 Oct;41(19):8969-78.
- [104] Stone MD, Mihalusova M, O'Connor C M, Prathapam R, Collins K, Zhuang X. Stepwise protein-mediated RNA folding directs assembly of telomerase ribonucleoprotein. *Nature*. 2007 Mar 22;446(7134):458-61.
- [105] Lai CK, Miller MC, Collins K. Roles for RNA in telomerase nucleotide and repeat addition processivity. *Mol Cell*. 2003 Jun;11(6):1673-83.
- [106] Chen JL, Opperman KK, Greider CW. A critical stem-loop structure in the CR4-CR5 domain of mammalian telomerase RNA. *Nucleic Acids Res*. 2002 Jan 15;30(2):592-7.
- [107] Tesmer VM, Ford LP, Holt SE, Frank BC, Yi X, Aisner DL, et al. Two inactive fragments of the integral RNA cooperate to assemble active telomerase with the human protein catalytic subunit (hTERT) in vitro. *Mol Cell Biol*. 1999 Sep;19(9):6207-16.
- [108] Mitchell JR, Collins K. Human telomerase activation requires two independent interactions between telomerase RNA and telomerase reverse transcriptase. *Mol Cell*. 2000 Aug;6(2):361-71.
- [109] Robart AR, Collins K. Investigation of human telomerase holoenzyme assembly, activity, and processivity using disease-linked subunit variants. *J Biol Chem*. 2009 Feb 12;285(7):4375-86.
- [110] Canudas S, Houghtaling BR, Bhanot M, Sasa G, Savage SA, Bertuch AA, et al. A role for heterochromatin protein 1gamma at human telomeres. *Genes Dev*. 2011 Sep 1;25(17):1807-19.
- [111] Walne AJ, Vulliamy T, Beswick R, Kirwan M, Dokal I. TINF2 mutations result in very short telomeres: analysis of a large cohort of patients with dyskeratosis congenita and related bone marrow failure syndromes. *Blood*. 2008 Nov 1;112(9):3594-600.
- [112] Sasa GS, Ribes-Zamora A, Nelson ND, Bertuch AA. Three novel truncating TINF2 mutations causing severe dyskeratosis congenita in early childhood. *Clin Genet*. 2012 May;81(5):470-8.
- [113] Xin ZT, Ly H. Characterization of interactions between naturally mutated forms of the TIN2 protein and its known protein partners of the shelterin complex. *Clin Genet*. 2012 Mar;81(3):301-2.
- [114] Yang D, He Q, Kim H, Ma W, Songyang Z. TIN2 protein dyskeratosis congenita missense mutants are defective in association with telomerase. *J Biol Chem*. 2011 Jul 1;286(26):23022-30.

- [115] Frescas D, de Lange T. A TIN2 dyskeratosis congenita mutation causes telomerase-independent telomere shortening in mice. *Genes Dev.* 2014 Jan 15;28(2):153-66.
- [116] Henriksson S, Farnebo M. On the road with WRAP53beta: guardian of Cajal bodies and genome integrity. *Front Genet.* 2015;6:91.
- [117] Stern JL, Zyner KG, Pickett HA, Cohen SB, Bryan TM. Telomerase recruitment requires both TCAB1 and Cajal bodies independently. *Mol Cell Biol.* 2012 Jul;32(13):2384-95.
- [118] Zhong F, Savage SA, Shkreli M, Giri N, Jessop L, Myers T, et al. Disruption of telomerase trafficking by TCAB1 mutation causes dyskeratosis congenita. *Genes Dev.* 2011 Jan 1;25(1):11-6.
- [119] Trahan C, Martel C, Dragon F. Effects of dyskeratosis congenita mutations in dyskerin, NHP2 and NOP10 on assembly of H/ACA pre-RNPs. *Hum Mol Genet.* 2009 Mar 1;19(5):825-36.
- [120] Vulliamy T, Beswick R, Kirwan M, Marrone A, Digweed M, Walne A, et al. Mutations in the telomerase component NHP2 cause the premature ageing syndrome dyskeratosis congenita. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Jun 10;105(23):8073-8.
- [121] Keller RB, Gagne KE, Usmani GN, Asdourian GK, Williams DA, Hofmann I, et al. CTC1 Mutations in a patient with dyskeratosis congenita. *Pediatr Blood Cancer.* 2012 Aug;59(2):311-4.
- [122] Walne AJ, Bhagat T, Kirwan M, Gitiaux C, Desguerre I, Leonard N, et al. Mutations in the telomere capping complex in bone marrow failure and related syndromes. *Haematologica.* 2013 Mar;98(3):334-8.
- [123] Chen LY, Majerska J, Lingner J. Molecular basis of telomere syndrome caused by CTC1 mutations. *Genes Dev.* 2013 Oct 1;27(19):2099-108.
- [124] White MF. Structure, function and evolution of the XPD family of iron-sulfur-containing 5'-->3' DNA helicases. *Biochem Soc Trans.* 2009 Jun;37(Pt 3):547-51.
- [125] Uringa EJ, Lisaingo K, Pickett HA, Brind'Amour J, Rohde JH, Zelensky A, et al. RTEL1 contributes to DNA replication and repair and telomere maintenance. *Mol Biol Cell.* 2012 Jul;23(14):2782-92.
- [126] Ballew BJ, Yeager M, Jacobs K, Giri N, Boland J, Burdett L, et al. Germline mutations of regulator of telomere elongation helicase 1, RTEL1, in Dyskeratosis congenita. *Hum Genet.* 2013 Apr;132(4):473-80.
- [127] Le Guen T, Jullien L, Touzot F, Schertzer M, Gaillard L, Perderiset M, et al. Human RTEL1 deficiency causes Hoyeraal-Hreidarsson syndrome with short telomeres and genome instability. *Hum Mol Genet.* 2013 Aug 15;22(16):3239-49.

- [128] Stuart BD, Choi J, Zaidi S, Xing C, Holohan B, Chen R, et al. Exome sequencing links mutations in PARN and RTEL1 with familial pulmonary fibrosis and telomere shortening. *Nat Genet.* 2015 May;47(5):512-7.
- [129] Stanley SE, Noth I, Armanios M. What the genetics "RTEL"ing us about telomeres and pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2015 Mar 15;191(6):608-10.
- [130] Fedick AM, Shi L, Jalas C, Treff NR, Ekstein J, Kornreich R, et al. Carrier screening of RTEL1 mutations in the Ashkenazi Jewish population. *Clin Genet.* 2014 Aug;88(2):177-81.
- [131] Korner CG, Wahle E. Poly(A) tail shortening by a mammalian poly(A)-specific 3'-exoribonuclease. *J Biol Chem.* 1997 Apr 18;272(16):10448-56.
- [132] Mason PJ, Bessler M. mRNA deadenylation and telomere disease. *J Clin Invest.* 2015 May;125(5):1796-8.
- [133] Ohga S, Kai T, Honda K, Nakayama H, Inamitsu T, Ueda K. What are the essential symptoms in the Hoyeraal-Hreidarsson syndrome? *Eur J Pediatr.* 1997 Jan;156(1):80-1.
- [134] Hoyeraal HM, Lamvik J, Moe PJ. Congenital hypoplastic thrombocytopenia and cerebral malformations in two brothers. *Acta Paediatr Scand.* 1970 Mar;59(2):185-91.
- [135] Hreidarsson S, Kristjansson K, Johannesson G, Johannsson JH. A syndrome of progressive pancytopenia with microcephaly, cerebellar hypoplasia and growth failure. *Acta Paediatr Scand.* 1988 Sep;77(5):773-5.
- [136] Aalfs CM, van den Berg H, Barth PG, Hennekam RC. The Hoyeraal-Hreidarsson syndrome: the fourth case of a separate entity with prenatal growth retardation, progressive pancytopenia and cerebellar hypoplasia. *Eur J Pediatr.* 1995 Apr;154(4):304-8.
- [137] Savage SA, Alter BP. Dyskeratosis congenita. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2009 Apr;23(2):215-31.
- [138] Sznajder Y, Baumann C, David A, Journal H, Lacombe D, Perel Y, et al. Further delineation of the congenital form of X-linked dyskeratosis congenita (Hoyeraal-Hreidarsson syndrome). *Eur J Pediatr.* 2003 Dec;162(12):863-7.
- [139] Cossu F, Vulliamy TJ, Marrone A, Badiali M, Cao A, Dokal I. A novel DKC1 mutation, severe combined immunodeficiency (T+B-NK- SCID) and bone marrow transplantation in an infant with Hoyeraal-Hreidarsson syndrome. *Br J Haematol.* 2002 Dec;119(3):765-8.
- [140] Borggraefe I, Koletzko S, Arenz T, Fuehrer M, Hoffmann F, Dokal I, et al. Severe variant of x-linked dyskeratosis congenita (Hoyeraal-Hreidarsson Syndrome) causes significant enterocolitis in early infancy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2009 Sep;49(3):359-63.

- [141] Malbora B, Avci Z, Ozbek N. Aplastic anemia and Hoyeraal-Hreidarsson syndrome. *Skinmed*. 2014 Mar-Apr;12(2):117-8.
- [142] Ballew BJ, Joseph V, De S, Sarek G, Vannier JB, Stracker T, et al. A recessive founder mutation in regulator of telomere elongation helicase 1, RTEL1, underlies severe immunodeficiency and features of Hoyeraal Hreidarsson syndrome. *PLoS Genet*. 2013 Aug;9(8):e1003695.
- [143] Knight SW, Heiss NS, Vulliamy TJ, Aalfs CM, McMahon C, Richmond P, et al. Unexplained aplastic anaemia, immunodeficiency, and cerebellar hypoplasia (Hoyeraal-Hreidarsson syndrome) due to mutations in the dyskeratosis congenita gene, DKC1. *Br J Haematol*. 1999 Nov;107(2):335-9.
- [144] Lai W, Deng WP, Liu X, Chen HM, Dai Sh X. A recurrent p. A353V mutation in DKC1 responsible for different phenotypes of dyskeratosis congenita in a Chinese family. *J Dermatol Sci*. 2011 Aug;63(2):122-4.
- [145] Marrone A, Sokhal P, Walne A, Beswick R, Kirwan M, Killick S, et al. Functional characterization of novel telomerase RNA (TERC) mutations in patients with diverse clinical and pathological presentations. *Haematologica*. 2007 Aug;92(8):1013-20.
- [146] Gramatges MM, Qi X, Sasa GS, Chen JJ, Bertuch AA. A homozygous telomerase T-motif variant resulting in markedly reduced repeat addition processivity in siblings with Hoyeraal Hreidarsson syndrome. *Blood*. 2013 May 2;121(18):3586-93.
- [147] Vogiatzi P, Perdignes N, Mason PJ, Wilson DB, Bessler M. A family with Hoyeraal-Hreidarsson syndrome and four variants in two genes of the telomerase core complex. *Pediatr Blood Cancer*. 2013 Jun;60(6):E4-6.
- [148] Vulliamy TJ, Walne A, Baskaradas A, Mason PJ, Marrone A, Dokal I. Mutations in the reverse transcriptase component of telomerase (TERT) in patients with bone marrow failure. *Blood Cells Mol Dis*. 2005 May-Jun;34(3):257-63.
- [149] Ye JZ, Hockemeyer D, Krutchinsky AN, Loayza D, Hooper SM, Chait BT, et al. POT1-interacting protein PIP1: a telomere length regulator that recruits POT1 to the TIN2/TRF1 complex. *Genes Dev*. 2004 Jul 15;18(14):1649-54.
- [150] Takai KK, Kibe T, Donigian JR, Frescas D, de Lange T. Telomere protection by TPP1/POT1 requires tethering to TIN2. *Mol Cell*. 2011 Nov 18;44(4):647-59.
- [151] Kocak H, Ballew BJ, Bisht K, Eggebeen R, Hicks BD, Suman S, et al. Hoyeraal-Hreidarsson syndrome caused by a germline mutation in the TEL patch of the telomere protein TPP1. *Genes Dev*. 2014 Oct 1;28(19):2090-102.
- [152] Guo Y, Kartawinata M, Li J, Pickett HA, Teo J, Kilo T, et al. Inherited bone marrow failure associated with germline mutation of ACD, the gene encoding telomere protein TPP1. *Blood*. 2014 Oct 30;124(18):2767-74.

- [153] Revesz T, Fletcher S, al-Gazali LI, DeBuse P. Bilateral retinopathy, aplastic anaemia, and central nervous system abnormalities: a new syndrome? *J Med Genet.* 1992 Sep; 29(9):673-5.
- [154] Tsilou ET, Giri N, Weinstein S, Mueller C, Savage SA, Alter BP. Ocular and orbital manifestations of the inherited bone marrow failure syndromes: Fanconi anemia and dyskeratosis congenita. *Ophthalmology.* 2010 Mar;117(3):615-22.
- [155] Anderson BH, Kasher PR, Mayer J, Szykiewicz M, Jenkinson EM, Bhaskar SS, et al. Mutations in CTC1, encoding conserved telomere maintenance component 1, cause Coats plus. *Nat Genet.* 2012 Mar;44(3):338-42.
- [156] Polvi A, Linnankivi T, Kivela T, Herva R, Keating JP, Makitie O, et al. Mutations in CTC1, encoding the CTS telomere maintenance complex component 1, cause cerebroretinal microangiopathy with calcifications and cysts. *Am J Hum Genet.* 2012 Mar 9;90(3):540-9.
- [157] Savage SA. Connecting complex disorders through biology. *Nat Genet.* 2012 Mar; 44(3):238-40.
- [158] Yamaguchi H, Baerlocher GM, Lansdorp PM, Chanock SJ, Nunez O, Sloand E, et al. Mutations of the human telomerase RNA gene (TERC) in aplastic anemia and myelodysplastic syndrome. *Blood.* 2003 Aug 1;102(3):916-8.
- [159] Scheinberg P, Cooper JN, Sloand EM, Wu CO, Calado RT, Young NS. Association of telomere length of peripheral blood leukocytes with hematopoietic relapse, malignant transformation, and survival in severe aplastic anemia. *JAMA.* 2010 Sep 22;304(12):1358-64.
- [160] Kim HJ, Perlman D, Tomic R. Natural history of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med.* 2015 Jun;109(6):661-70.
- [161] Loyd JE. Pulmonary fibrosis in families. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003 Sep;29(3 Suppl):S47-50.
- [162] Armanios MY, Chen JJ, Cogan JD, Alder JK, Ingersoll RG, Markin C, et al. Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med.* 2007 Mar 29;356(13):1317-26.
- [163] Tsakiri KD, Cronkhite JT, Kuan PJ, Xing C, Raghu G, Weissler JC, et al. Adult-onset pulmonary fibrosis caused by mutations in telomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 May 1;104(18):7552-7.
- [164] Diaz de Leon A, Cronkhite JT, Katzenstein AL, Godwin JD, Raghu G, Glazer CS, et al. Telomere lengths, pulmonary fibrosis and telomerase (TERT) mutations. *PLoS One.* 2010;5(5):e10680.
- [165] Povedano JM, Martinez P, Flores JM, Mulero F, Blasco MA. Mice with Pulmonary Fibrosis Driven by Telomere Dysfunction. *Cell Rep.* 2015 Jul 14;12(2):286-99.

- [166] Cogan JD, Kropski JA, Zhao M, Mitchell DB, Rives L, Markin C, et al. Rare variants in RTEL1 are associated with familial interstitial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015 Mar 15;191(6):646-55.
- [167] Alder JK, Chen JJ, Lancaster L, Danoff S, Su SC, Cogan JD, et al. Short telomeres are a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Sep 2;105(35):13051-6.
- [168] Armanios M. Syndromes of telomere shortening. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2009;10:45-61.
- [169] Kropski JA, Mitchell DB, Markin C, Polosukhin VV, Choi L, Johnson JE, et al. A novel dyskerin (DKC1) mutation is associated with familial interstitial pneumonia. *Chest*. 2014 Jul;146(1):e1-7.
- [170] Fukuhara A, Tanino Y, Ishii T, Inokoshi Y, Saito K, Fukuhara N, et al. Pulmonary fibrosis in dyskeratosis congenita with TINF2 gene mutation. *Eur Respir J*. 2013 Dec; 42(6):1757-9.
- [171] Stanley SE, Chen JJ, Podlevsky JD, Alder JK, Hansel NN, Mathias RA, et al. Telomerase mutations in smokers with severe emphysema. *J Clin Invest*. 2015 Feb;125(2): 563-70.
- [172] Parry EM, Alder JK, Qi X, Chen JJ, Armanios M. Syndrome complex of bone marrow failure and pulmonary fibrosis predicts germline defects in telomerase. *Blood*. 2011 May 26;117(21):5607-11.
- [173] Calado RT, Brudno J, Mehta P, Kovacs JJ, Wu C, Zago MA, et al. Constitutional telomerase mutations are genetic risk factors for cirrhosis. *Hepatology*. 2011 May;53(5): 1600-7.
- [174] Fogarty PF, Yamaguchi H, Wiestner A, Baerlocher GM, Sloand E, Zeng WS, et al. Late presentation of dyskeratosis congenita as apparently acquired aplastic anaemia due to mutations in telomerase RNA. *Lancet*. 2003 Nov 15;362(9396):1628-30.
- [175] Gadalla SM, Sales-Bonfim C, Carreras J, Alter BP, Antin JH, Ayas M, et al. Outcomes of allogeneic hematopoietic cell transplantation in patients with dyskeratosis congenita. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013 Aug;19(8):1238-43.
- [176] Ayas M, Nassar A, Hamidieh AA, Kharfan-Dabaja M, Othman TB, Elhaddad A, et al. Reduced intensity conditioning is effective for hematopoietic SCT in dyskeratosis congenita-related BM failure. *Bone Marrow Transplant*. 2013 Sep;48(9):1168-72.
- [177] Islam A, Rafiq S, Kirwan M, Walne A, Cavenagh J, Vulliamy T, et al. Haematological recovery in dyskeratosis congenita patients treated with danazol. *Br J Haematol*. 2013 Sep;162(6):854-6.

- [178] Calado RT, Yewdell WT, Wilkerson KL, Regal JA, Kajigaya S, Stratakis CA, et al. Sex hormones, acting on the TERT gene, increase telomerase activity in human primary hematopoietic cells. *Blood*. 2009 Sep 10;114(11):2236-43.
- [179] Khincha PP, Wentzensen IM, Giri N, Alter BP, Savage SA. Response to androgen therapy in patients with dyskeratosis congenita. *Br J Haematol*. 2014 May;165(3):349-57.
- [180] Ziegler P, Schrezenmeier H, Akkad J, Brassat U, Vankann L, Panse J, et al. Telomere elongation and clinical response to androgen treatment in a patient with aplastic anemia and a heterozygous hTERT gene mutation. *Ann Hematol*. 2012 Jul;91(7):1115-20.
- [181] Giri N, Pitel PA, Green D, Alter BP. Splenic peliosis and rupture in patients with dyskeratosis congenita on androgens and granulocyte colony-stimulating factor. *Br J Haematol*. 2007 Sep;138(6):815-7.
- [182] Zlateska B, Ciccolini A, Dror Y. Treatment of dyskeratosis congenita-associated pulmonary fibrosis with danazol. *Pediatr Pulmonol*. 2015 50(12):48-51.
- [183] Noble PW, Albera C, Bradford WZ, Costabel U, du Bois RM, Fagan EA, et al. Pirfenidone for idiopathic pulmonary fibrosis: analysis of pooled data from three multinational phase 3 trials. *Eur Respir J*. 2015 Jan;47(1):243-53.
- [184] Richeldi L, du Bois RM, Raghu G, Azuma A, Brown KK, Costabel U, et al. Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*. 2014 May 29;370(22):2071-82.
- [185] Giri N, Lee R, Faro A, Huddleston CB, White FV, Alter BP, et al. Lung transplantation for pulmonary fibrosis in dyskeratosis congenita: Case Report and systematic literature review. *BMC Blood Disord*. 2011;11:3.
- [186] Silhan LL, Shah PD, Chambers DC, Snyder LD, Riise GC, Wagner CL, et al. Lung transplantation in telomerase mutation carriers with pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*. 2014 Jul;44(1):178-87.
- [187] Blasco MA, Lee HW, Hande MP, Samper E, Lansdorp PM, DePinho RA, et al. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell*. 1997 Oct 3;91(1):25-34.
- [188] Lee HW, Blasco MA, Gottlieb GJ, Horner JW, 2nd, Greider CW, DePinho RA. Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs. *Nature*. 1998 Apr 9;392(6676):569-74.
- [189] Raval A, Behbehani GK, Nguyen le XT, Thomas D, Kusler B, Garbuzov A, et al. Reversibility of Defective Hematopoiesis Caused by Telomere Shortening in Telomerase Knockout Mice. *PLoS One*. 2015;10(7):e0131722.

- [190] Herrera E, Samper E, Martin-Caballero J, Flores JM, Lee HW, Blasco MA. Disease states associated with telomerase deficiency appear earlier in mice with short telomeres. *EMBO J*. 1999 Jun 1;18(11):2950-60.
- [191] Gu BW, Bessler M, Mason PJ. A pathogenic dyskerin mutation impairs proliferation and activates a DNA damage response independent of telomere length in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jul 22;105(29):10173-8.
- [192] Beier F, Foronda M, Martinez P, Blasco MA. Conditional TRF1 knockout in the hematopoietic compartment leads to bone marrow failure and recapitulates clinical features of dyskeratosis congenita. *Blood*. 2012 Oct 11;120(15):2990-3000.
- [193] Simeonova I, Jaber S, Draskovic I, Bardot B, Fang M, Bouarich-Bourimi R, et al. Mutant mice lacking the p53 C-terminal domain model telomere syndromes. *Cell Rep*. 2013 Jun 27;3(6):2046-58.
- [194] Garcia-Cao I, Garcia-Cao M, Martin-Caballero J, Criado LM, Klatt P, Flores JM, et al. "Super p53" mice exhibit enhanced DNA damage response, are tumor resistant and age normally. *EMBO J*. 2002 Nov 15;21(22):6225-35.
- [195] Ramunas J, Yakubov E, Brady JJ, Corbel SY, Holbrook C, Brandt M, et al. Transient delivery of modified mRNA encoding TERT rapidly extends telomeres in human cells. *FASEB J*. 2015 May;29(5):1930-9.
- [196] Maida Y, Masutomi K. Telomerase reverse transcriptase moonlights: Therapeutic targets beyond telomerase. *Cancer Sci*. 2015 106(11):1486-92.
- [197] Gu BW, Fan JM, Bessler M, Mason PJ. Accelerated hematopoietic stem cell aging in a mouse model of dyskeratosis congenita responds to antioxidant treatment. *Aging Cell*. 2011 Apr;10(2):338-48.
- [198] Machado-Pinilla R, Sanchez-Perez I, Murguia JR, Sastre L, Perona R. A dyskerin motif reactivates telomerase activity in X-linked dyskeratosis congenita and in telomerase-deficient human cells. *Blood*. 2008 Mar 1;111(5):2606-14.
- [199] Machado-Pinilla R, Carrillo J, Manguan-Garcia C, Sastre L, Mentzer A, Gu BW, et al. Defects in mTR stability and telomerase activity produced by the Dkc1 A353V mutation in dyskeratosis congenita are rescued by a peptide from the dyskerin TruB domain. *Clin Transl Oncol*. 2012 Oct;14(10):755-63.
- [200] Manguan-Garcia C, Pintado-Berninches L, Carrillo J, Machado-Pinilla R, Sastre L, Perez-Quilis C, et al. Expression of the genetic suppressor element 24.2 (GSE24.2) decreases DNA damage and oxidative stress in X-linked dyskeratosis congenita cells. *PLoS One*. 2014;9(7):e101424.
- [201] Iarriccio L, Manguan-Garcia C, Pintado-Berninches L, Mancheno JM, Molina A, Perona R, et al. GSE4, a Small Dyskerin- and GSE24.2-Related Peptide, Induces Telomerase Activity, Cell Proliferation and Reduces DNA Damage, Oxidative Stress and Cell Senescence in Dyskerin Mutant Cells. *PLoS One*. 2015;10(11):e0142980.

- [202] Egusquiaguirre SP, Manguan-Garcia C, Pintado-Berninches L, Iarriccio L, Carbajo D, Albericio F, et al. Development of surface modified biodegradable polymeric nanoparticles to deliver GSE24.2 peptide to cells: a promising approach for the treatment of defective telomerase disorders. *Eur J Pharm Biopharm.* 2015 Apr;91:91-102.

INTECH

INTECH